

Aus dem Institut für Tierernährung
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. M. Wanner

Einfluss von Calcium und Vitamin D
auf den Knochenstoffwechsel und die Intensität der Vitamin D-Rezeptoren-
sowie Calbindin D9k-Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt
von Ziegenlämmern

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von

Kerstin Lauff

Tierärztin von Forst (D)

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. Annette Liesegang, Referentin
Prof. Dr. Alois Boos, Korreferent

Zürich 2009

Meinen Eltern,
meiner Schwester
und Marco

Was ich weiss ist ein Tropfen,
was ich nicht weiss ein Ozean.

(Isaac Newton)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziel der Arbeit	1
1.2	Topographie und Morphologie des Magen-Darm-Traktes beim kleinen Wiederkäuer	1
1.3	Histomorphologie des Gastrointestinaltraktes	2
1.3.1	Histomorphologische Beschreibung der Vormägen	3
1.3.2	Histomorphologische Beschreibung des Darmtraktes	3
1.4	Aufbau der Nieren	4
1.5	Der Calciumstoffwechsel bei der Ziege	6
1.5.1	Calcium im Körper	6
1.5.2	Calciumbedarf	6
1.5.3	Hypocalcämie	7
1.5.4	Regulation des Calciumstoffwechsels	8
1.6	Calciumabsorption im Gastrointestinaltrakt	11
1.6.1	Passiver Calciumtransport	12
1.6.2	Aktiver Calciumtransport	12
1.7	Calciumabsorption beim Wiederkäuer	15
1.8	Calciumrückresorption in der Niere	19
1.9	Vitamin D-Rezeptor	20
1.9.1	Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	20
1.9.2	Struktur und Funktion	21
1.10	Calbindin D9k	23
1.10.1	Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	23
1.10.2	Struktur und Funktion	24
1.10.3	Calbindin im Darm	25
1.10.4	Calbindin in der Niere	27
1.11	VDR und Calbindin beim Wiederkäuer	29
1.12	Grundprinzipien der Immunhistochemie	31
2	Literaturverzeichnis	33

3	Manuskript	42
	Abstract	42
	Introduction	44
	Material and methods	46
	Results	51
	Discussion	76
	Conclusions	81
	References	82
4	Schlussfolgerung	88
5	Danksagung	91
6	Curriculum Vitae	

Abbkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	µg	Mikrogramm
ABC	Avidin-Biotin-Complex	µmol	Mikromol
ATP	Adenosintriphosphat	mRNA	messenger-
a.p.	ante partum		Ribonukleinsäure
Ca	Calcium	Na	Natrium
CaBP	Calcium bindende Proteine	NCX	natrium calcium exchanger
Calb9k	Calbindin D9k	ng	Nanogramm
Calb28k	Calbindin D28k	n. u.	nicht untersucht
CaT	calcium transporter	P	Phosphor
cGMP	cyclisches Guanosinmono- phosphat	p.p.	post partum
Cr ₂ O ₃	Chrom(III)-oxid	PTH	Parathormon
CT	Calcitonin	PMCA	plasma membrane calcium- ATPase
DAB	Chromogen 3'3'Diamino- benzidin	RNA	Ribonukleinsäure
DBP	Vitamin D bindendes Protein	RT-PCR	Reverse Transkriptions- Polymerase-Kettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RXR	Retinoid X-Rezeptor
ECaC	epithelial calcium channel	SCFA	short chain fatty acid
GIT	Gastrointestinaltrakt	Tab.	Tabelle
I.E.	Internationale Einheiten	TRPV	transient receptor potential vanilloid channel
IGF	insulin like growth factor	TBS	Tris gepufferte NaCl- Lösung
i.p.	intraperitoneal	VDR	Vitamin D-Rezeptor
J _{net}	Nettofluxrate	VDRE	Vitamin D-Response Element
K	Kalium	Vit D	Vitamin D
K _d	Bindungskapazität	1,25VitD	1,25-Dihydroxychole- calciferol
kDa	Kilo-Dalton	25VitD	25-Hydroxycholecalciferol
KGW	Körpergewicht		
KO	knockout		
mmol	Millimol		

Vorbemerkung

Diese Dissertation besteht aus einer Zusammenfassung (deutsch und englisch), einer Einleitung, in der die Fragestellung mit der Literatur verglichen wird, einem Manuskript, das zur Veröffentlichung an eine Zeitschrift mit Begutachtungsprozess eingereicht wird und einer Schlussfolgerung. Im Anschluss folgen die Danksagung und das Curriculum vitae.

Zusammenfassung

Einfluss von Calcium und Vitamin D auf den Knochenstoffwechsel und die Intensität der Vitamin D-Rezeptoren- sowie Calbindin D9k-Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt von Ziegenlämmern.

Das Ziel der Studie war es, den Einfluss von Calcium (Ca) und Vitamin D (VitD) auf den Knochenstoffwechsel, die Intensität von VitD-Rezeptoren-(VDR) und Calbindin D9k-(Calb9k) Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt (GIT) von Ziegenlämmern zu untersuchen. Die Ziegen und ihre Lämmer wurden in 2 Fütterungsgruppen eingeteilt (Ca-normal und Ca-erniedrigt; pro Gruppe erhielt die Hälfte der Lämmer 1 Woche vor der Schlachtung eine VitD-Injektion).

Die Tiere mit der Ca-armen Diät zeigten eine verminderte Knochendichte. Dies konnte sowohl bei den Ziegen um die Geburt als auch deren Lämmern in den ersten Lebensmonaten nachgewiesen werden. Der Knochenstoffwechsel der Lämmer schien sich an den niedrigen Ca-Gehalt im Futter zu adaptieren. Mittels Ussing-Kammer-Technik konnte eine Ca-Absorption im Pansen der Lämmer gezeigt werden. Die höchsten VDR-Immunreaktionen wurden im Duodenum nachgewiesen und nahmen im caudalen GIT ab. Calb9k-Reaktionen konnten im Vormagen und GIT nachgewiesen werden, wobei im Duodenum die höchsten Immunreaktionen messbar waren. Ziegenlämmer mit einer VitD-Injektion zeigten zusätzlich im distalen GIT Calb9k Reaktionen.

Diese Ergebnisse zeigen im Duodenum die höchsten Gehalte an VDR und Calb9k, dort findet ein aktiver, VitD-abhängiger Ca-Transport statt. Die Expression von Calb9k im Darm der Lämmer wird scheinbar durch die VitD-Injektion stimuliert. Im Pansen könnte die aktive Ca-Absorption in Anwesenheit von Calb9k VitD-unabhängig sein.

Summary

Influence of different calcium supplies and vitamin D on bone metabolism, vitamin D receptor- and calbindin D9k-immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids.

The purpose of this study was to investigate, if different calcium (Ca) concentrations in diets and vitamin D (Vit D) have an influence on bone metabolism, vitamin D receptor- (VDR) and calbindin D9k- (Calb9k) immunoreactivities in the gastrointestinal tract of growing goats. Dairy goats and their offspring were divided in two feeding groups (Ca low and Ca normal; half of the goat kids of each group were treated with vitamin D 1 week before sacrifice).

There is clear evidence that a low Ca diet results in a lower bone mineral density around birth in goats and in the first month of life in goat kids. Nevertheless, in goat kids the bone seems to adapt on Ca intake within time. Active Ca absorption was observed in rumen of the goat kids measured with Ussing-chamber-technique. VDR immunoreactions were highest in duodenal mucosa and lower in the distal intestinal segments. Calb9k immunoreactions were observed in forestomach and intestines with the highest expression in the duodenum. The kid groups with Vit D injection showed an additional immunoreaction in the distal intestines.

The results of this study indicate that VDR and Calb9k are highly expressed in the duodenum, where an active Vit D dependent Ca absorption is evident. Calb9k expression seems to be stimulated in these parts of the intestine by the active form of vitamin D in goat kids. In rumen, the active mechanisms of Ca absorption seem to be Vit D independent in presence of Calb9k.

1 Einleitung

Die Calcium(Ca)-Homöostase ist beim Wiederkäuer durch Trächtigkeit und Laktation grossen Herausforderungen ausgesetzt. Da sowohl die gastrointestinale Ca-Absorption als auch die renale Ca-Exkretion eine unzureichende Adaptation an den damit zusammenhängenden gesteigerten Ca-Bedarf aufweisen und sich daraus folgeschwere Imbalancen im Ca-Stoffwechsel ergeben, entstehen im peripartalen Zeitraum vermehrt klinische und subklinische Erkrankungen, denen eine grosse wirtschaftliche Bedeutung beigemessen wird. Dabei dürfen die bisherigen umfangreichen Erkenntnisse vom monogastrischen Tier nicht ohne Weiteres auf den Wiederkäuer übertragen werden.

1.1 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen des gastrointestinalen und renalen Ca-Transportes beim Wiederkäuer darzustellen. Dazu wurden semiquantitative Untersuchungen mittels immunhistochemischer Methoden an Geweben durchgeführt, um fütterungsbedingte Auswirkungen im Gastrointestinaltrakt (GIT) und der Niere, unter Berücksichtigung einer zusätzlichen Vitamin D-Gabe, zu ermitteln. Es wurde überprüft, ob es Unterschiede gibt bezüglich der Mobilisation von Ca aus dem Knochen und/oder der Absorption von Ca aus dem GIT bei Ziegenlämmern, die Ca-bedarfsgerecht und Ca-restriktiv gefüttert wurden. Des Weiteren wurden mittels Ussing-Kammer-Technik Untersuchungen am Pansen und dem Duodenum durchgeführt, um bereits detailliert beschriebene Daten beim Wiederkäuer zu ergänzen.

1.2 Topographie und Morphologie des Magen-Darm-Traktes beim kleinen Wiederkäuer

Der Wiederkäuermagen ist ein mehrhöhlig-zusammengesetzter Magen. Er besteht aus dem dreiteiligen Vormagen, Proventriculus, mit einer drüsenlosen, kutanen Schleimhaut und dem mit Drüsen Schleimhaut ausgekleideten Labmagen (Drüsenmagen, Abomasum). Der Vormagen besteht aus dem Pansen (Rumen), der Haube (Reticulum) und dem Blättermagen (Omasum) (Abb. 1).

Der voll entwickelte Wiederkäuermagen bildet mit seinen Teilen eine U-förmig gelegte Kette. Der Pansen liegt links, die Haube kranial, der Blättermagen rechts. Der Labmagen lagert sich an die ventrale Bauchwand an und schiebt sich mit dem Fundus teilweise links der Medianen unter und zwischen Haube und Pansen ein, der Corpus zieht nach rechts und die Pars pylorica

steigt nach rechts hinter den Blättermagen dorsal auf. Der dorsale Pansensack ist im Ursprungsbereich des dorsalen Magengekröses flächenhaft mit den Zwerchfellpfeilern und der linken inneren Lendenmuskulatur verklebt. Auch die weitere Befestigung erfolgt über das Magengekröse, das aus dem grossen und kleinen Netz besteht¹.

Der Darm setzt sich aus dem engeren Dünndarm (Intestinum tenue) und dem weiteren Dickdarm (Intestinum crassum) zusammen und endet im Afterkanal. Der Dünndarm gliedert sich in Duodenum, Jejunum und Ileum.

Der Dickdarm besteht aus dem Cäkum (Blinddarm), dem Colon (Grimmdarm) und dem Rectum (Mastdarm)¹.

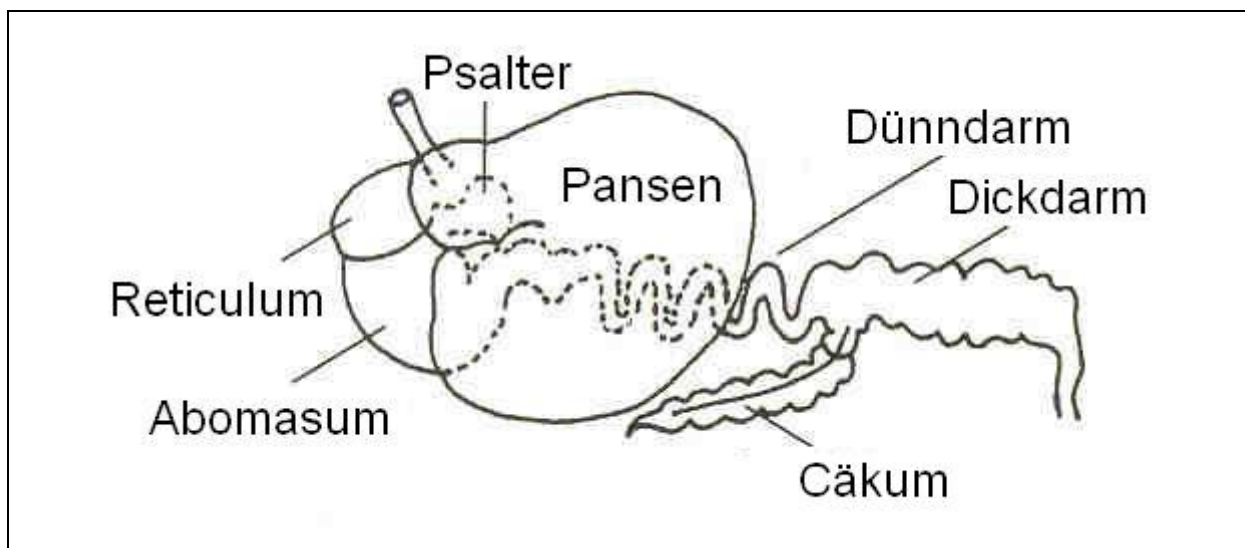


Abb. 1: Darstellung des Magen-Darm-Traktes der Ziege².

1.3 Histomorphologie des Gastrointestinaltraktes

Die Innenauskleidung des gesamten Magen-Darm-Traktes weist grundsätzlich einen gleichartigen Grundbauplan auf. Vom Lumen nach aussen hin sind folgende Schichten zu nennen³:

- Tunica mucosa
 - Lamina epithelialis mucosae,
 - Lamina propria mucosae,
 - Lamina muscularis mucosae (fehlt im Pansen),
- Tela submucosa,
- Tunica muscularis
 - Stratum circulare,
 - Stratum longitudinale,

- Tunica adventitia, anstelle einer Tunica adventitia kann ausgebildet sein eine
- Tela subserosa,
- Tunica serosa
 - Lamina propria serosae,
 - Lamina epithelialis serosae

Diese verschiedenen Schichten kann man in unterschiedlich starken Ausprägungen in dem gesamten GIT beobachten.

1.3.1 Histomorphologische Beschreibung der Vormägen

Sämtliche inneren Wandflächen der Vormägen werden von einer drüsenlosen Schleimhaut ausgekleidet. Das Epithelium mucosae der Vormägen ist stets ein mehrschichtiges Plattenepithel, welches funktionsbedingt schwach verhornen kann. Das Epithel liegt einem deutlichem Papillarkörper auf. In der Tela submucosa verzweigen sich Gefäße in kleinere Äste, Arteriolen. Diese bilden subepithelial und in Papillarkörpern Kapillarnetze, die sich in postkapilläre Venolen fortsetzen. Venöse Gefäße sammeln sich wieder in der Tela submucosa und ziehen durch die Muskelschicht nach aussen. Hier liegen auch Lymphgefäße und autonome, intramurale Ganglien. Aussen liegt eine zirkulär und longitudinal geschichtete Tunica muscularis an, der meist eine Tunica serosa angrenzt³.

1.3.2 Histomorphologische Beschreibung des Darmtraktes

Dünndarm

Der Dünndarm setzt sich funktionell und strukturell aus drei unterschiedlichen Abschnitten zusammen (Duodenum, Jejunum und Ileum). Die gesamte Tunica mucosa wird von Dünndarmzotten (Villi intestinales) gebildet, die fingerförmige Ausstülpungen der Lamina propria mucosae darstellen und von einem einschichtigen Epithel (Epithelium mucosae) überzogen werden. Die Dünndarmzotten der Wiederkäuer sind kurz und gedrungen und im Jejunum am längsten, während sie sich im Duodenum und im Ileum verkürzen. Neben diesen Ausstülpungen wird die Schleimhaut durch die Ausbildung von Einstülpungen in die Lamina propria mucosae durch schlauchförmige, gerade und unverzweigte Darmdrüsen (Glandulae intestinales, Lieberkühn-Drüsen, Krypten) gekennzeichnet. Die Epithelzellen am Grund der Schlauchdrüsen unterliegen ständigen mitotischen Teilungen, es schieben sich permanent Tochterzellen lumenwärts zur Zottenspitze vor und erneuern die abgeschilferten Epithelzellen der Zottenwand. Die Oberfläche der Zotten und die epitheliale Wandauskleidung der Krypten werden von einem einschichtigen Epithel (Epithelium mucosae) gebildet. Die Tunica mucosa des Darms ist durchgehend eine echte Schleimhaut. Die verschiedenen Zellen (Saumzellen,

Becherzellen, endokrine Zellen und Paneth-Zellen) unterscheiden sich in Struktur und Funktion³.

Dickdarm

Der Dickdarm ist unterteilt in Cäkum, Colon und Rektum. Auch diese Abschnitte zeigen die Schichtung eines häutig-muskulären Schlauches. In allen Dickdarmabschnitten fehlen Darmzotten. Die innere glatte Wandauskleidung besteht aus längsverlaufenden Falten und in die Tiefe senken sich Glandulae intestinales ein. Die innere Darmoberfläche wird von einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel ausgekleidet, dessen Saumzellen (Enterozyten) an der Oberfläche Mikrovilli entwickeln und die Zelloberfläche vergrößern. Die Drüsenwand und ihre Deckzellen werden von proximal nach distal durch eine steigende Anzahl von Becherzellen ersetzt. Diese Epithelzellen unterliegen einer ständigen Erneuerung, die aus undifferenzierten Zellen des Drüsenhalses erfolgt³.

1.4 Aufbau der Nieren

Im Unterschied zur gefurchten mehrwarzigen Niere des Rindes und der glatten mehrwarzigen Niere bei Schwein und Mensch sind die Nieren der Ziege glatt und einwarzig. Die Nieren von Ziegen haben eine gedrungene Bohnenform mit rundlichem Querschnitt und deutlichem, nicht sehr tiefem Hilus. Die rechte Niere liegt retroperitoneal. Ihr kranialer Pol liegt in Höhe der 13. Rippe und ihr kaudaler Pol im Bereich des 2. Lendenwirbels. Die linke Niere dagegen liegt intraperitoneal und wird auch als physiologische Wanderniere bezeichnet. Sie liegt deutlich weiter kaudal unter dem 4. und 5. Lendenwirbel sowie rechts vom dorsalen Pansensack⁴. Der Aufbau der Niere ist bereits makroskopisch erkennbar. Das Nierenparenchym ist von einer festen, bindegewebigen Nierenkapsel (Capsula fibrosa) umschlossen. Am Hilus der Niere geht die Kapsel in die Adventitia des Nierenbeckens über. Unter der Kapsel liegt ein lockeres Stratum subfibrosum mit einigen glatten Muskelzellen. Die Kapsel ist punktförmig mit wenigen feinen Blutgefäßen mit dem Nierenparenchym verbunden. Das Nierenparenchym ist von aussen nach innen in Schichten und Zonen und radiär in Lappen und Läppchen unterteilt. Aussen liegt in ungleichmässiger Dicke die Nierenrinde (Cortex renis). Innen, dem Nierenbecken zugewandt ist das Nierenmark (Medulla renis) und wird jeweils zwischen zwei Interlobulargefäßen in Markpyramiden (Pyramides renales) gegliedert. Die Basis der Pyramide (Basis pyramides) liegt an der Rindenkalotte und die Spitze (Papilla renalis) im Nierenkelch oder zieht in einer gemeinsamen Leiste (Crista renalis) in das Nierenbecken hinein. Bei der Ziege kommt es zu einer Verschmelzung von Rindenkalotten und Markpyramiden, die Nierenpapillen sind zu einer einzigen Nierenleiste verschmolzen⁴.

Der Feinbau der Niere wird in Abbildung 2 dargestellt.

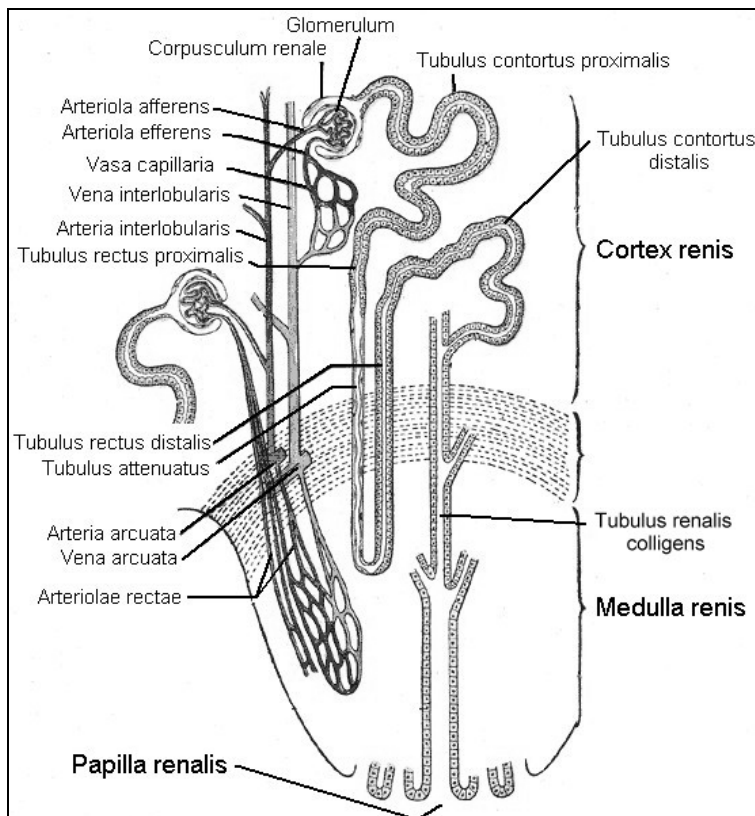


Abb. 2: Aufbau eines Nierenlappens³.

Die funktionelle Einheit ist das Nephron. Es besteht aus dem Nierenkörperchen und dem Nierentubulus. Das Nierenkörperchen wird auch als Malphigisches Körperchen bezeichnet, hat eine kugelige Gestalt und ist etwa 0,1 bis 0,3 mm gross. Pro Niere findet man, je nach Tierspezies 200'000 bis 4 Millionen dieser Strukturen. Das Nierenkörperchen, Glomerulum, ist der Ort der Ultrafiltration und besteht aus einem Netz von Blutkapillaren und einer zweiblättrigen Kapsel, Capsula glomeruli. Am Gefässpol befinden sich zu- und abführende Arterien, die in ein Kapillarnetz münden. Hier besteht ein sehr hoher Blutdruck und durch das Innenblatt der Capsula glomeruli, welches als Membran dient, wird ein Ultrafiltrat des Blutplasmas, der sogenannte Primärharn, hergestellt. Das äussere Blatt der Kapsel öffnet sich am Harnpol und leitet den Primärharn in das Nierenkanälchen. Der Nierentubulus, Tubulus renalis, besteht aus mehreren Teilstücken, die nach ihrer Lage, Form und Durchmesser benannt werden und funktionell variieren. Der Nierentubulus ist Ort der Rückresorption von Wasser und Stoffen aus dem Primärharn, die nicht ausgeschieden werden sollen. Des Weiteren findet eine Exkretion verschiedener Stoffe statt. So findet man folgende Tubulusstrecken: 1. Tubulus contortus proximalis, 2. Tubulus rectus proximalis, 3. Tubulus

attenuatus, 4. Tubulus rectus distalis und 5. Tubulus contortus distalis. Die geraden Teilstücke (2, 3 und 4) bilden gemeinsam die Ansa nephroni, auch Henlesche Schleife genannt, die weit in das Nierenmark reicht. Die gewundenen Teilstücke (1 und 5) sind in der Nähe ihres Glomerulus in der Nierenrinde angelagert. Die dem Glomerulus zugewandten Zellen und andere Zellen bilden eine weitere regulatorische Einrichtung, den sogenannten juxtaglomerulären Komplex. Über ein kurzes Verbindungsstück (Tubulus renalis arcuatus) erlangt das Nephron Anschluss an das Sammelrohr (Tubulus colligens rectus bzw. Ductus papillaris). Hier findet ein osmotischer Wasserentzug statt und der Harn erhält seine Endkonzentration, wie er über die Harnblase ausgeschieden wird⁴.

1.5 Der Calciumstoffwechsel bei der Ziege

1.5.1 Calcium im Körper

Calcium ist einer der wichtigsten Mineralstoffe im Körper und für viele körperliche Funktionen unentbehrlich. Die ionisierte Form von Ca ist nicht nur am Knochenstoffwechsel beteiligt, sondern auch an der Blutgerinnung, der Nervenregbarkeit, der Muskelkontraktion, der Hormonfreisetzung und der Membranpermeabilität. In den verschiedenen Lebensphasen der Ziege, wie Wachstum, Trächtigkeit, Geburt und Milchsynthese ist der Ca-Stoffwechsel immer wieder grossen Anforderungen unterworfen. Ca wird zu 99% im Knochen gespeichert und bei Bedarf daraus mobilisiert, wobei nur 0,5% des Ca aus dem Knochen schnell mobilisierbar ist⁵. Die Ca-Konzentration im Blut wird durch verschiedene Regulationsmechanismen in engen Grenzen gehalten (2,2 – 2,8 mmol/l)⁶. Für die Aufrechterhaltung des konstanten Ca-Spiegels im Blut sind vier Organe verantwortlich: der GIT, die Nieren, die Knochen und die Nebenschilddrüse. Drei Hormone (Parathormon (PTH) 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25VitD) und Calcitonin (CT)) sind die wesentlichen Regulatoren der Ca-Homöostase.

1.5.2 Calciumbedarf

Der Erhaltungsbedarf einer 60 kg schweren, nicht laktierenden Milchziege beträgt 2,5 g Ca pro Tag⁷. Im 4. und 5. Trächtigkeitsmonat steigt dieser Bedarf auf 7,5 bzw. 9,5 g Ca pro Tag an. Während der Laktation benötigt eine Milchziege bei einer täglichen Milchleistung von 2 kg 11 g Ca (Erhaltung + 2 kg Milch)⁷. Ein Liter Ziegenmilch enthält 1,14 – 1,63 g Ca. Zu Beginn der Laktation zeigen Ca und auch Phosphor (P) meist eine negative Bilanz, d.h. Ca und P müssen aus dem Knochen freigesetzt werden. Die Absorptionsrate im Darm sowie die renale Rückresorption werden gesteigert, um den enormen Bedarf in diesem Zeitraum zu

decken und die Homöostase zu erhalten. In der zweiten Hälfte der Laktation wird diese negative Bilanz normalerweise problemlos ausgeglichen, da der Bedarf deutlich geringer ist. Ziegenlämmer haben im ersten und zweiten Lebensmonat einen Bedarf von 5 g Ca pro Tag. Ab dem vierten Lebensmonat sinkt der tägliche Bedarf auf 4,5 g Ca ab. Ab dem 6. Lebensmonat benötigen sie 4 g Ca pro Tag nach dem 7. Lebensmonat liegt der tägliche Bedarf bei 3 g⁷. Bis zum Absetzen ist der Bedarf vorerst über die Muttermilch gedeckt. Bei einer Zufütterung muss auf eine ausreichende Mineralstoffversorgung geachtet werden.

1.5.3 Hypocalcämie

Adulte tragende Tiere, die Ca nicht durch erhöhte Absorption aus dem Darm und erhöhte Knochenmobilisierung bereitstellen können, erkranken an Hypocalcämie, Gebärparese bzw. Milchfieber⁸. Diese Erkrankung mit einem akuten Ca-Mangel verursacht beim Wiederkäuer eine progressive neuromuskuläre Dysfunktion mit schlaffer Lähmung, Kreislaufkollaps und Bewusstseinsveränderung. Milchkühe erkranken rund um den Geburtszeitpunkt und zeigen charakteristisch erniedrigte Blut-Ca-Werte. Es handelt sich um eine leistungs-, fütterungs- und altersabhängige Stoffwechselstörung, die auch genetischen Einflüssen unterliegt. Eine hohe Milchleistung erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung⁹. In einer Studie zeigte sich, dass Milchkühe mit hoher Milchleistung eine höhere Knochenresorptions- und Knochenformationsrate haben als Kühe mit geringerer Milchleistung¹⁰. Mit zunehmendem Alter des Rindes steigt das Risiko an Hypocalcämie zu erkranken, da die Fähigkeit der Ca-Mobilisation aus dem Knochen abnimmt. Parallel dazu steigt die Milchproduktion und die Zahl der Vitamin D Rezeptoren im Darm sinkt¹¹. Erstlingskühe erkranken aus diesem Grunde sehr selten an Hypocalcämie⁹. Liesegang et al.¹² diskutierten als mögliche Ursache der Hypocalcämie bei der Milchkuh eine verminderte Ca-Resorption aus dem Knochen. Eine weitere Ursache könnte eine verminderte Ca-Absorption aus dem Darm sein. In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich Kühe mit Gebärparese und Kühe ohne Gebärparese bezüglich der Knochenresorption nicht signifikant unterscheiden. Ziegen, Schafe und Jungrinder zeigen eine deutlich niedrigere Inzidenz an Hypocalcämie zu erkranken als ausgewachsene Milchkühe⁹. Vor allem Ziegen mit hoher Milchleistung und/oder Mehrlingsgeburten sind gefährdet vor und auch nach der Geburt an einer Hypocalcämie zu erkranken. Diese Ziegen erkranken etwa 2 Tage vor bis 2 Tage nach der Geburt an einer Gebärparese¹³. Bei einer intensiven Haltung mit hohen Milchleistungen tritt bei Ziegen häufiger die postpartale Form auf. Ziegen in einer extensiven Haltungsform zeigen eher die präpartale Form⁹. Klinisch weisen Ziegen mit Hypocalcämie vor der Geburt ähnliche

Symptome wie Schafe auf. Es kommt zu einer Überempfindlichkeit mit Tetanie und schlaffen Lähmungen. Milchziegen, die nach der Geburt an Hypocalcämie erkranken und somit die typische Erkrankungsform wie Milchkühe erkennen lassen, entwickeln weniger starke klinische Symptome als diese⁹. Auch eine Studie von Yamagishi et al.¹⁴ wies bei experimentell ausgelöster Hypocalcämie durch Hämodialyse nach, dass Ziegen unter ähnlichen Symptomen leiden wie Milchkühe. Zu diesen gehören typischerweise Ataxie, Zitterigkeit, Lähmungen, gefolgt vom Festliegen¹⁴. Weiterhin kann es zu Konstipation, reduzierter Pansenmotorik und Blähungen kommen¹⁵.

Die Normwerte für das Gesamt-Ca bei erwachsenen nicht tragenden Ziegen und Schafen liegen bei 2,2-2,8 mmol/l¹⁶. Um den Geburtszeitpunkt zeigten sich bei Ziegen Werte um 2,4 mmol/l, wobei einen Tag vor der Geburt Ca im Serum absank und 5 Tage nach der Geburt auf die Normwerte zurückkehrte¹⁷. Eine Studie von Liesegang et al.¹⁸ ergab normale Blut-Ca-Werte um den Geburtszeitpunkt bei Ziegen und konnte die Aussage von Matthews¹⁹ nicht bestätigen, dass ein Ca-Abfall im Blut um den Geburtszeitpunkt durch die beginnende Milchproduktion bei Ziegen physiologischerweise stattfindet. Im Gegensatz dazu, ist bei Ziegen, die an Hypocalcämie erkranken, ein deutlicher Ca-Abfall im Blut nachweisbar, da der erhöhte Ca-Bedarf nicht durch den Ca-Metabolismus gedeckt werden kann¹⁹. Ca-Werte im Serum unter 1-1,25 mmol/l sprechen diagnostisch für eine Hypocalcämie¹⁵.

1.5.4 Regulation des Calciumstoffwechsels

Calcium liegt im Serum zu 55% als ionisiertes Ca, zu 40% gebunden an Protein und zu 5% in Verbindung mit organischen Säuren vor⁶. Der Ca-Stoffwechsel wird vornehmlich durch PTH, 1,25VitD und CT reguliert. Andere Hormone, wie beispielsweise Insulin, Sexualhormone und Schilddrüsenhormone spielen nur eine untergeordnete Rolle.

1.5.4.1 Parathormon

Parathormon, ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren, wird von den Hauptzellen der Nebenschilddrüse (Epithelkörperchen) sezerniert. Die Epithelkörperchen reagieren mit Hilfe membranständiger, extrazellulärer Rezeptoren schnell auf einen Ca-Abfall im Blut und PTH gelangt über die Blutbahn zu den Zielzellen²⁰. PTH mobilisiert Ca und P aus dem Knochen und steigert die tubuläre Ca-Rückresorption und die tubuläre P-Ausscheidung in der Niere⁶. PTH stimuliert in der Niere die Bildung der aktiven Form des Vitamin D, 1,25VitD, aus der Vorstufe 25-(OH)Vitamin D. PTH erhöht den Ca-Spiegel im Blut und verhindert eine Hypocalcämie⁵.

1.5.4.2 Calcitonin

Calcitonin, ein Peptidhormon aus 32 Aminosäuren, wird von den C-Zellen der Schilddrüse sezerniert und ist als Antagonist zu PTH zu sehen. Steigt der Ca-Spiegel im Blut an, wird dies durch Sensoren in den C-Zellen der Schilddrüse erkannt und die CT-Sekretion eingeleitet²¹. CT hemmt die Osteoklasten und fördert die Osteoblasten zur Einlagerung von Ca und P in den Knochen⁵. In der Niere wird die Ca-Ausscheidung durch CT erhöht.

1.5.4.3 Vitamin D

Die D-Vitamine gehören zu den fettlöslichen Vitaminen. Die wichtigsten Metaboliten sind Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol). Beide Formen gehören zu den Secosteroiden und unterscheiden sich in einer Seitenkette vom typischen Ringsystem des Cholesterols. Vitamin D₂ und seine Vorstufe Ergosterol kommen grösstenteils in pflanzlicher Nahrung und Mikroorganismen vor. Vitamin D₃ und seine Vorstufe 7-Dehydrocholesterol findet man überwiegend in tierischen Produkten. Vitamin D₂ und Vitamin D₃ sind beim Säuger in ihrer Leistungsfähigkeit identisch. Im Körper durchlaufen beide die gleichen Metabolisierungsschritte mit dem Unterschied, dass bei Vitamin D₂ 1,25-Dihydroxyergocalciferol und bei Vitamin D₃ 1,25-Dihydroxycholecalciferol als aktive Form entstehen. Die biologisch aktive Form, 1,25VitD, wird in der Niere aus der weniger aktiven Vorstufe 25-Hydroxycholecalciferol (25VitD) gebildet. Die wichtigste Funktion von 1,25VitD ist die Regulation der Ca-Homöostase, aber es ist auch an weiteren Prozessen, wie der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt^{22,23}. Vitamin D₃ wird einerseits über die Nahrung aufgenommen und andererseits unter dem Einfluss von Sonnenlicht in der Haut gebildet. Die UV-Strahlung führt zu einer photolytischen Umsetzung von 7-Dehydrocholesterol zu Provitamin D₃, gefolgt von einer Thermoisomerisierung zu Vitamin D₃²⁴. Das entstandene Vitamin D₃ (Cholecalciferol) gelangt über die Blutbahn zur Leber und durchläuft, wie das direkt aufgenommene Vitamin D, die Hydroxylierungsschritte in der Leber und der Niere zu 1,25VitD. (Abb. 3). Da der Körper selbst in der Lage ist, das Vitamin zu synthetisieren, ist die Bezeichnung „Vitamin“ nicht ganz korrekt. Dies gilt aber nur, wenn der Körper einer ausreichenden UV-B Exposition ausgesetzt ist²⁵. Ausnahmen sind Hunde und Katzen, die Vitamin D nicht über die Haut synthetisieren können^{26,27}. Beim Rind, und auch anderen Säugern, wird der Vitamin D-Bedarf zu 80-90% durch die kutane Synthese gedeckt²⁸. Da aber viele Nutztiere in Stallhaltung leben, muss Vitamin D über die Nahrung supplementiert werden. Die tägliche Ration von Ziegen beträgt 250 – 1500 Internationale Einheiten (I.E.) pro Tag⁷. Mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin D₃, wie auch das

biosynthetische Vitamin D₂, werden im Darm resorbiert und durch Chylomikronen über die Blutbahn zur Leber transportiert. Hier findet die erste Hydroxylierung mittels 25-Hydroxylase (ein Cytochrom-P450-Enzym) zum 25VitD statt. Diese Verbindung gelangt über die Blutbahn zur Niere und wird durch ein weiteres Cytochrom-P450-Enzym, die 1- α -Hydroxylase, zur aktiven Form 1,25VitD hydroxyliert. Die Aktivität der 25-Hydroxylase in der Leber ist kaum reguliert und daher ist die Vitamin D-Aufnahme proportional zur Bildung von 25VitD und wird als Indikator für den Vitamin D-Status eingesetzt²⁹⁻³¹. Die Aktivität der 1- α -Hydroxylase in der Niere ist streng reguliert. Sie wird durch PTH und geringe Konzentrationen an Ca und P im Blut stimuliert, während sie durch 1,25VitD selbst gehemmt wird⁵. Die genomische Wirkung von 1,25VitD wird durch Bindung an die spezifischen Vitamin D-Rezeptoren (VDR) vermittelt (siehe Kapitel 1.9).

Im Darm stimuliert 1,25VitD die Ca-Absorption durch eine gesteigerte Expression von epithelialen Ca-Kanälen, cytosolischen Transportproteinen und der membranständigen Ca-ATPase. In der Niere erfolgt die Stimulierung über die gesteigerte Expression des Natrium-Ca-Austauschers, gleichzeitig hemmt es die renale Exkretion³². Im Knochen ist die Wirkung von 1,25VitD unter anderem abhängig von der alimentären Ca-Aufnahme und von CT. Bei adäquater Ca-Versorgung unterdrückt 1,25VitD die Bildung von PTH, steigert die Expression von Osteocalcin, Osteopontin und β_3 -Integrin in den Osteoklasten, was zur Mineralisierung und Bildung der Knochenmatrix führt. Bei inadäquater Ca-Versorgung wirkt 1,25VitD mit PTH synergistisch bei der Stimulierung der Osteoklastenbildung und die Aktivität der Osteoblasten wird durch Induktion des in der Cytoplasma-Membran lokalisierten Proteins Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) gehemmt. 1,25VitD fördert die Mineralisierung der Epiphysenfugen durch Steigerung der Ca-Konzentration im Blut und Hemmung von PTH, unterstützt jedoch gleichzeitig die Ca-mobilisierende Wirkung des PTH³³.

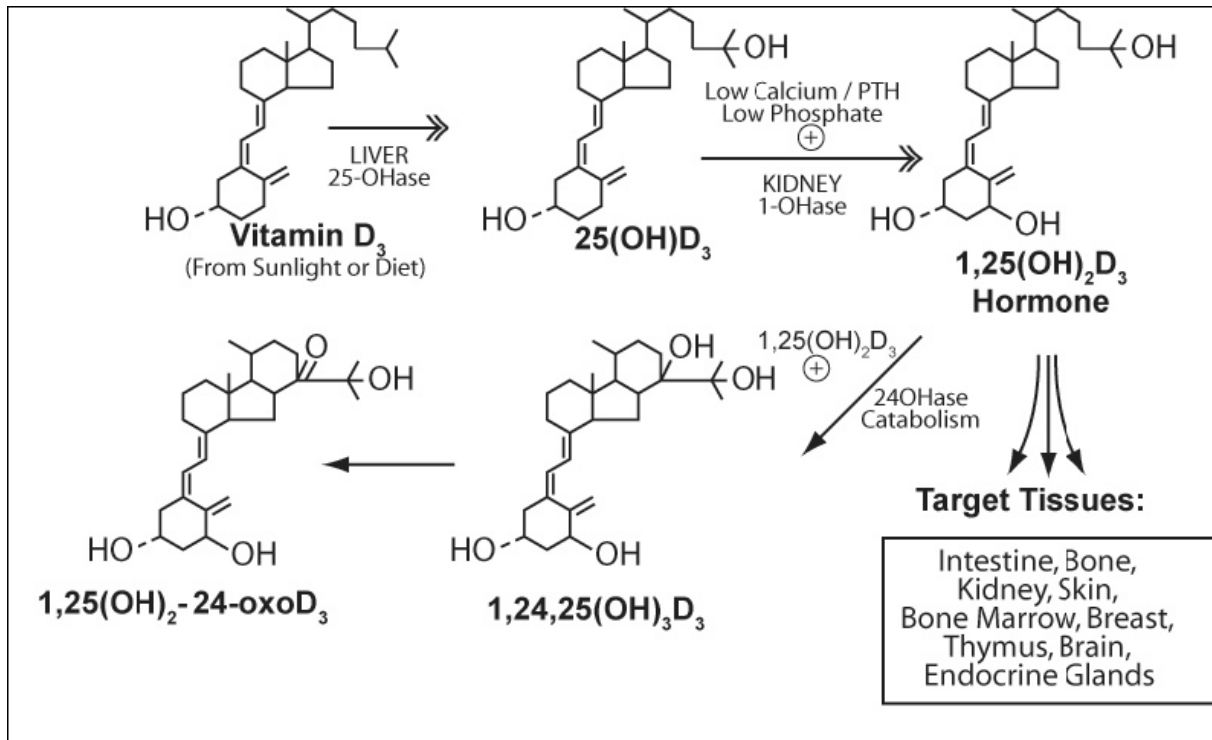


Abb. 3: Aktivierungsschritte von Vitamin D₃ durch Hydroxylierung an Position C-25 in der Leber und an Position C-1 in der Niere. Tiefe Ca- und PTH-Werte im Blut aktivieren das Enzym 1- α -Hydroxylase in der Niere³⁴.

1.6 Calciumabsorption im Gastrointestinaltrakt

Der GIT spielt eine zentrale Rolle bei der Absorption von Ca. Durch das Darmepithel erfolgt der Ca-Transport in beide Richtungen. Er ist bidirektional. Im oberen Dünndarm kann Ca resorbiert und zusammen mit den Verdauungssäften sezerniert werden³⁵. Im Darm werden zwei Transportmechanismen unterschieden, ein transzellulärer, metabolisch angetriebener Transport und ein parazellulärer, passiver, nicht sättigbarer Prozess. Die Mechanismen werden durch Hormone, Nährstoffe und andere Faktoren reguliert. Unter physiologischen Bedingungen wird Ca vor allem im Dünndarm absorbiert, ca. 90% der Gesamt-Ca-Absorption³⁶.

In einer Studie von Breves und Schröder³⁵ wurden die vergleichenden Aspekte der gastrointestinalen Ca-Umsetzung beim Schwein und Wiederkäuer zusammenfassend dargestellt und gezeigt, dass die zellulären Mechanismen wie sie für monogastrische Tierarten gelten, beim Wiederkäuer noch genauer untersucht werden müssen. Beim Schwein finden über 90 % der Ca-Nettoabsorption im Dünndarm statt. Der Magen und der Dickdarm spielen nur eine untergeordnete Rolle. Beim Schaf scheinen alle Darmsegmente an der Ca-Nettoabsorption beteiligt zu sein³⁵. Beim Wiederkäuer wird Ca zusätzlich über die Pansenschleimhaut aufgenommen^{35,37,38}. Die Bioverfügbarkeit von mit der Nahrung

zugeführtem Ca wirkt sich zusätzlich auf die Effizienz der intestinalen Ca-Absorption aus. Die Ca-Fütterung sowie Wachstum, Trächtigkeit und Laktation stimulieren die intestinale Ca-Absorption, wobei mit zunehmendem Alter die Ca-Absorption sinkt. Die Ca-Absorption wird durch verringerte VDR-Rezeptorenanzahl im Darm deutlich reduziert³⁹.

1.6.1 Passiver Calciumtransport

Der passive Transport von Ca erfolgt überwiegend parazellulär über die *tight junctions* und benötigt einen elektrochemischen Gradienten zwischen der luminalen und der basolateralen Seite des Darmepithels³². Tight junctions sind interzelluläre Strukturen die Plasma-Membranen benachbarter Zellen in sehr engem Kontakt halten³². Dieser passive, nicht sättigbare Prozess herrscht im Jejunum und Ileum, vor allem bei hoher Ca-Aufnahme, vor. Er ist weiterhin abhängig von der Löslichkeit des Ca in den distalen Dünndarmabschnitten, der Aufenthaltsdauer des Chymus und von der Diffusionsrate im jeweiligen Darmsegment aus dem Lumen ins Lymph- bzw. Blutssystem⁴⁰. Goff et al.⁴¹ konnten diesen Absorptionsweg bei Milchkühen über die gesamte Darmlänge nachweisen. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer hohen Ca-Zufuhr mehr als 50% des Ca passiv über den parazellulären Transportweg im Darmtrakt aufgenommen haben^{42,43}. Die Bedeutung der passiven Ca-Absorption konnten auch Wassermann und Fullmer⁴⁴ darstellen. Ihre Ergebnisse zeigten, dass der parazelluläre Transport von Ca mit steigender Konzentration an freiem Ca im Chymus zunimmt⁴⁴. Im Gegensatz dazu zeigte Bronner⁴⁵ beim Monogastrier, dass bei einer geringen Ca-Konzentration im Darmtrakt eine aktive Ca-Absorption im Vordergrund steht. Weitere Untersuchungen am Dünndarm von Ratten zeigten, dass durch parenterale Gabe von 1,25VitD eine gesteigerte Ca-Absorption, anhand erhöhter parazellulärer Ca-Netto Fluxes, ausgelöst wurde. Karbach⁴⁶ vermutete, dass der passive Ca-Transport über den so genannten Solvent-drag-Mechanismus statt findet. Dabei wird durch die aktive Absorption von Natrium-Ionen oder Aminosäuren ein osmotischer Gradient erzeugt, der zu einem parazellulären Nachstrom von Wasser und den darin gelösten Ionen führt. Des Weiteren könnte 1,25VitD die chemische Struktur der tight junctions verändern und somit einen erhöhten parazellulären Ca-Transport induzieren⁴⁶.

1.6.2 Aktiver Calciumtransport

Der aktive Transport erfolgt in der Regel transzellulär und ist 1,25VitD-abhängig²². Dieser Transportmechanismus ist sättigbar und beim Monogastrier vorwiegend auf das Duodenum und das proximale Jejunum beschränkt^{5,32}. Dieser komplexe Prozess lässt sich funktionell in drei Teilschritte unterteilen (Abb. 4):

1. Calciumeinstrom durch die Bürstensaummembran in die Enterozyten

Die Bürstensaummembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die für Ca-Ionen undurchlässig ist. Das Zellinnere ist gegenüber dem Extrazellulärraum negativ geladen und im Intrazellulärraum ist die Konzentration an freien Ca-Ionen mit $0,1$ bis $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sehr niedrig und es kommt entlang diesem elektrochemischen Gradienten zu einem Ca-Import über die apicale Membran⁴⁷. Durch spezifische epitheliale Ca-Membrankanäle, TRPV5 und TRPV6 (transient receptor potential vanilloid), gelangt Ca mittels elektrochemischen Gradienten in das Cytoplasma der Enterozyten. TRPV5 und -6 befinden sich auf der Bürstensaummembran der Enterozyten und es ist durchaus möglich, dass der Ca-Einstrom ein limitierender Faktor innerhalb der intestinalen Ca-Absorption ist⁴⁸. Der TRPV5-Kanal, auch ECaC1 (epithelial Ca channel) oder CaT2 (Ca transporter) genannt, wurde erstmals beim Kaninchen in Plazenta, Niere und Dünndarm beschrieben⁴⁹. TRPV5 hat vorwiegend in der Niere eine Funktion als Transportkanal⁵⁰. Der TRPV6-Kanal (ECaC2 oder CaT1) wurde nahezu zeitgleich im GIT der Ratte nachgewiesen⁵¹. Der Ca-Kanal TRPV6 herrscht überwiegend im Dünndarm vor⁵². Die Kanäle gehören zur TRP-Familie und sind grundsätzlich bei niedrigen Ca-Konzentrationen und Membranpotenzialen aktiv. Sie sind 100-mal selektiver für Ca-Ionen als für Na-Ionen. Die biologische Aktivität wird durch vier regulatorische Mechanismen kontrolliert. Erstens wird die Expression durch das Hormon 1,25VitD reguliert. Zweitens ist die Aktivierung pH- und Ca-abhängigen regulatorischen Mechanismen unterworfen. Drittens ist ein Transport von TRPV5/6 auf die luminal Plasmamembranseite erforderlich, um die biologische Aktivität ausüben zu können, und viertens sind für die Regulierung erst kürzlich identifizierte Kanal-assoziierte Proteine verantwortlich⁵³. Die Kanal-assoziierten Proteine, bspw. Calmodulin oder S100A10-Annexin 2, binden sich an Lipide der Zellmembran und regulieren den Ca-Einstrom durch Verbindung mit dem Kanal TRPV5 und/oder TRPV6 an der Zelloberfläche oder durch direkte Interaktion mit dem Kanal⁵³.

In verschiedenen Tiermodellen konnte festgestellt werden, dass Ca-Transportkanäle eine Vitamin D-Abhängigkeit zeigen^{50,54-57}.

VDR-knockout(KO)-Tiere zeigten deutlich weniger TRPV5 bzw. -6²³. Cromphaut et al.⁵⁷ konnten TRPV6, mittels einer einmaligen Injektion von 1,25VitD ($2 \mu\text{g/kg}$ KGW, 6 Stunden vor Euthanasie), um das Sechsfache hoch regulieren. Als weitere beeinflussende Hormone erwiesen sich Östrogene und PTH⁵⁵ sowie Androgene⁵¹. Die genaueren Mechanismen sind dabei noch ungeklärt.

Mäuse, bei denen der TRPV6 Kanal nicht exprimiert wurde, zeigten eine starke Malabsorption von Ca^{48} . Auch Bianco et al.⁵⁸ zeigten, dass TRPV6-KO-Mäuse lebensfähig waren, aber eine um 60% verringerte intestinale Ca-Absorption, mangelhafte Gewichtszunahmen, verminderte Knochendichten und erniedrigte Fruchtbarkeitsraten aufwiesen⁵⁸. Diese Daten deuteten darauf hin, dass der TRPV6-Kanal eine wichtige Rolle innerhalb der Ca-Homöostase spielt, aber auch in anderen Geweben Auswirkungen zeigt.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass Ca nur in Anwesenheit dieser Membrankanäle in das Cytoplasma diffundieren kann. Benn et al.²² konnten aber mit TRPV6- und Calb9k-KO-Mäusen zeigen, dass eine nahezu ungestörte Ca-Absorption im Darm stattfindet. Sie wiesen darauf hin, dass es kompensatorische Proteine für Calb9k und möglicherweise weitere, aber noch unbekannte Ca-Kanäle und Ca-bindende Proteine neben TRPV6 und Calbindin geben könnte, die in der intestinalen Ca-Absorption involviert sind²².

2. Calciumtransport durch das Cytosol mittels Calbindin

Calcium in seiner freien Form kann wegen einer unverträglichen Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration nicht frei durch das Cytosol transportiert werden, da dies zur Zellapoptose führen würde⁵⁹. Daher wird Ca reversibel an Ca-bindende Proteine (CaBP) gebunden. Im Darm unterscheidet man zwei Calbindine, an die Ca gebunden wird: bei Säugetieren Calb9k, bei Vögeln Calbindin D28k (Calb 28k). Nach Bindung wird Ca durch transzellulären Transport von der apicalen Membran der Enterozyten auf die basale Seite der Zelle transportiert (siehe Kapitel 1.10). Dieser Prozess ist 1,25VitD abhängig.

3. Calciumausschleusung über die basolaterale Membran

Die Ca-Ionen werden an der basolateralen Membran gegen einen elektrochemischen Gradienten über einen energieabhängigen Prozess ausgeschleust. An der basolateralen Membran werden die Ca-Ionen entweder durch eine primär aktive, membranständige Ca-ATPase (PMCA1b) oder durch einen Natrium/Ca-Ionenaustauscher (NCX1) transportiert³⁶. Bei Säugetieren sind in den Enterozyten vorwiegend Ca-Pumpen aktiv³². Die Expression und Aktivität von PMCA1b ist an den Enterozyten der Zottenspitzen deutlich höher als an denen der intestinalen Krypten. Das könnte bedeuten, dass reife Enterozyten die grösste Kapazität für den transzellulären Ca-Transport aufweisen⁶⁰. Auch hier stimuliert Vitamin D die Synthese der PMCA1b-Pumpe⁵⁶. Der intestinale NCX ist zu ca. 20% für die Ca-Ausschleusung verantwortlich und vom elektrochemischen Gradienten abhängig⁶¹. Im Darm wurde NCX bisher in Ratten⁶¹, in Mäusen⁶² und in Hühnern⁶⁰, nicht aber in Kaninchen⁶³ nachgewiesen.

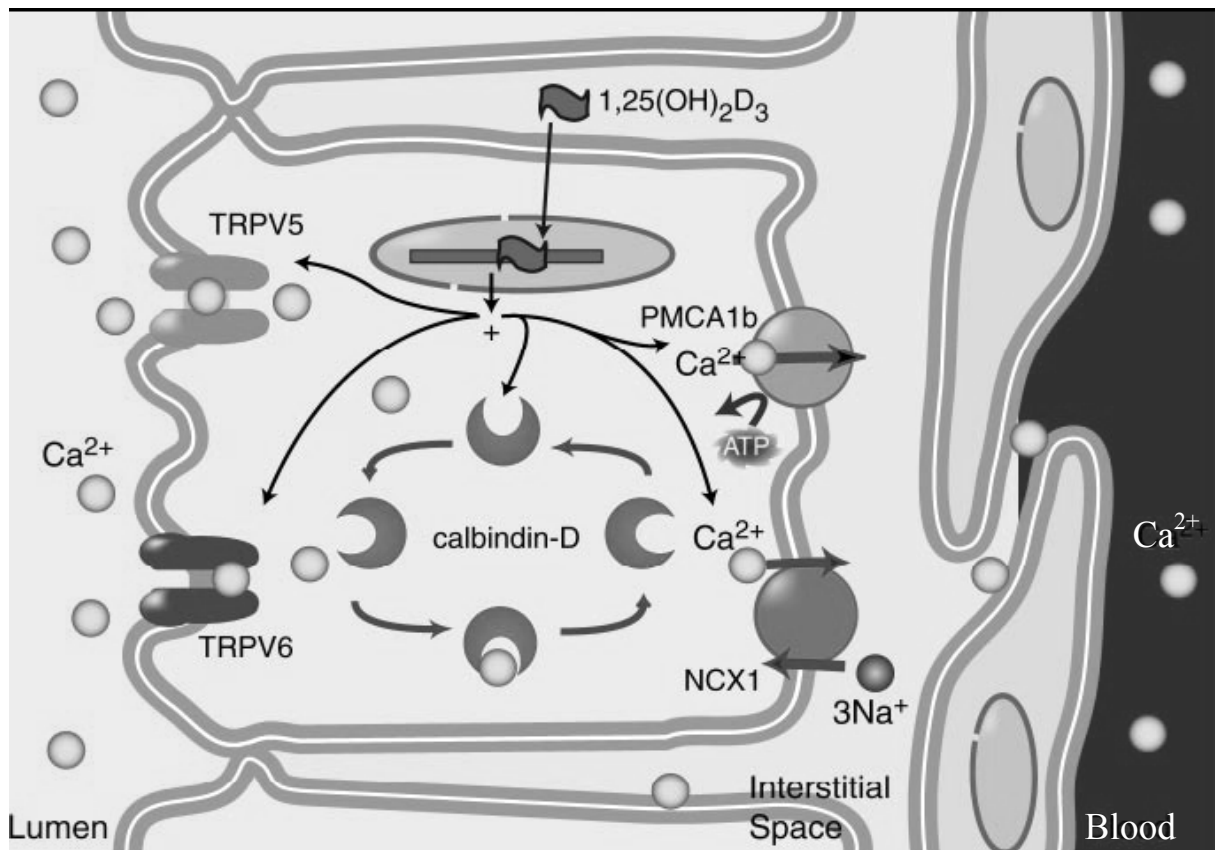


Abb. 4: Aktiver Ca-Transport im Darm⁵³.

1.7 Calciumabsorption beim Wiederkäuer

Im Gegensatz zu den meisten untersuchten Spezies weist der Wiederkäuer die Besonderheit eines Vormagensystems auf. Beim Wiederkäuer wird Ca auch im Pansen absorbiert³⁵. Der vor dem Dünndarm ablaufende Anteil der Ca-Nettoabsorption scheint mit steigender täglicher Ca-Aufnahme deutlich anzuwachsen³⁵. Inwieweit die ruminale Ca-Absorption auf die Ca-Homöostase eine Auswirkung hat, ist noch ungeklärt⁶⁴. Ergebnisse zum Ca-Transport über das Vormagenepithel differieren sehr stark. Phillipson und Storry⁶⁵ konnten am gewaschenen Reticulorumen von anästhesierten Schafen keine Durchlässigkeit für Ca feststellen. In in-vivo-Bilanzversuchen mit fistulierten Schafen zeigten die verschiedenen Abteilungen des Gastrointestinaltraktes eine unterschiedliche Ca-Nettoabsorption⁶⁶⁻⁷¹. Es wurden jeweils vor dem Duodenum sowohl Hinweise auf eine Nettoabsorption als auch auf eine Nettosekretion gefunden^{66,69,70} (Tab. 1). Die Ergebnisse lassen auf eine wichtige Rolle der Vormägen schließen und es folgten in-vitro-Studien. Mittels Ussing-Kammer-Technik wurde der Ca-Transport über die isolierte Pansenschleimhaut dargestellt. Es konnte in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten eine Nettoabsorption von Ca nachgewiesen und somit auf einen aktiven Ca-Transport geschlossen werden. Eine Blockierung der Na^+/K^+ -ATPase mit

Ouabain (Steroidhormon) führte zum Verschwinden der Ca-Absorption. Dies wies auf einen Na^+ -abhängigen und energieaufwändigen Ca-Transport hin⁷².

Tab. 1: tägliche Ca-Aufnahme, Ca-Bewegung im GIT und Ca-Ausscheidung im Kot bei adulten Schafen (in g/d); positive Werte bedeuten Nettoabsorption, negative Werte Netto-Sekretion

Aufnahme	präintestinal	Dünndarm	Dickdarm	Faeces	Autor
2,7	-0,8	1,9	-0,3	1,9	Wylie et al., 1985
3,0	-0,3	0,8	-0,2	2,7	Greene et al., 1983
3,2	0,6	1,0	-0,2	1,8	Dillon und Scott, 1979
4,2	-0,5	-0,5	0,6	4,6	Pfeffer et al., 1970
6,1	0,4	1,0	0,5	4,2	Ben-Ghedalia et al., 1982
6,3	0,3	0,5	0,1	5,4	Breves et al., 1985
7,9	2,4	-1,3	-0,1	6,9	Rayssiguier und Poncet, 1980
8,6	2,0	-1,4	1,1	6,9	Grace et al., 1974

Die Anwesenheit von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) im mucosalen Puffer hatte einen stimulierenden Effekt auf die Ca-Nettofluxe. Hier lagen die Werte bei ca. $5\text{-}10 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ^{38,73,74}. Eine noch grössere Wirkung hatte ein Gemisch aus Acetat, Propionat und Butyrat im physiologischen Verhältnis von 12:5:3⁷⁵. Uppal et al.⁷⁶ konnten demonstrieren, dass ein Ansteigen von SCFA praktisch einen linearen Anstieg der Ca-Nettofluxe bewirkt. Mit Kraftfutter gefütterte Tiere zeigten signifikant höhere Werte als Tiere, die nur Heu erhielten⁷⁶. Auch am Pansenepithel der Ziege konnten Breves et al.⁷⁷ eine aktive Ca-Absorption ($J_{\text{net}}=10,9 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) feststellen. Ähnliche Werte konnten auch Schröder et al.³⁸ am isolierten Pansenepithel bei wachsenden Ziegen nachweisen. Sie stellten eine Ca-Nettoabsorption von $16,5 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ fest, bei Ca-depletierten Tieren waren es $25,1 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ³⁸. Es gibt nur wenige Studien, die sich mit der Lokalisation der Ca-Absorption im GIT des Rindes beschäftigten und diese wiederum kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Die Anzahl der Versuchstiere war wegen der Praktikabilität in der Regel nur gering und die Tiere unterschieden sich in Geschlecht, Rasse, Alter, Fütterung und Laktations- sowie Trächtigkeitsstadium. Die Rinder waren in allen Versuchen chirurgisch mit

Kanülen und/oder Fisteln in verschiedenen Abschnitten des GIT versehen. Die Erfassung der segmentalen Ca-Flüsse erfolgte mittels Markertechnik (meist Cr_2O_3). Je nach Lokalisation der Kanülen konnten nicht nur die Ca-Gesamtaborption sondern auch eine Sekretion und/oder Absorption im präintestinalen Bereich sowie im Dün- und im Dickdarm unterschieden werden. Jedoch wurde nicht zwischen aktiven und passiven Transportvorgängen differenziert. Eine Zusammenfassung der Studien zeigt Tabelle 2. In den Berichten von Kemp et al.⁷⁸ und Van't Klooster⁷⁹ ergab sich eine Ca-Sekretion im präintestinalen Bereich, die durch eine Nettoabsorption im Dünndarm kompensiert wurde. Bei Tieren mit einer laktationsbedingten negativen Ca-Bilanz lag die Ca-Absorption mit $32,4 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ im Vergleich zu nichtlaktierenden Tieren deutlich höher⁷⁹. Diese Ergebnisse legten zunächst nahe, dass beim Rind, genau wie beim Monogastrier, eine Nettoabsorption von Ca im Duodenum und Jejunum stattfindet. In der Folge kamen aber verschiedene Autoren zu anderen Ergebnissen, denn mit Ausnahme von zwei weiteren Studien, in denen überwiegend eine Ca-Sekretion in den Mägen verzeichnet wurde^{80,81}, ergab sich zum Teil eine deutliche Ca-Nettoabsorption aus dem präintestinalen Kompartiment. Khorasani und Armstrong⁸² untersuchten bei vier Jersey-Rindern den Einfluss verschieden hoher Ca-Konzentrationen im Futter auf die Nettobewegungen im GIT. Der Hauptabsorptionsort für Ca befand sich in den Vormägen und im Labmagen. Im Dün- und Dickdarm wurde hingegen nur wenig Ca absorbiert oder sezerniert⁸². Rahnema et al.⁸³ stellten bei ihren Untersuchungen an fünf laktierenden Holstein-Kühen, deren Ration unterschiedliche Mengen an Fett enthielt, fest, dass die Nettoabsorption von Ca von der Menge des täglich aufgenommenen Ca abhängig war und dass bis auf eine Ausnahme stets eine überwiegend präintestinale Ca-Absorption erfolgte. Khorasani und Armstrong⁸⁴ überprüften an acht laktierenden Holstein-Friesian-Kühen den Einfluss verschiedener Silagen auf den Absorptionsort von Ca und weiterer Mengenelemente. Dabei stellten sie fest, dass die Ca-Verdaulichkeit nicht von der Art der Fütterung beeinflusst wurde, aber mit Erhöhung der täglich aufgenommenen Ca-Menge die präintestinale Ca-Absorption anstieg. Ergebnisse im Zusammenhang mit der alimentären Ca-Versorgung zeigten, dass es bei hohem Ca-Angebot in der Nahrung zu einer Verschiebung der Nettoabsorption zu Gunsten der präintestinalen Abschnitte kommt, wobei es nicht möglich war, zwischen dem Beitrag des Vormagensystems und dem des Labmagens zu unterscheiden. Dieses Prinzip konnte nicht nur in einer Studie mit laktierenden Kühen^{85,86}, sondern auch in einer Literaturlauswertung von an Rindern durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden⁸⁷.

Tab. 2: Ca-Bewegungen im GIT von Rindern (alle Angaben in g/d), positive Werte bedeuten Nettoabsorption, negative Werte bedeuten Nettosekretion

Alimentäre Ca- Aufnahme	Vormägen	Dünndarm	Dickdarm	Faeces	Bilanz	Autor
		Intestinal				
	-13	35				Kemp et al., 1973
31,6	-4,4	5,8	30,2	1,1		van't Klooster, 1976
60,1	-9,5	15,8	53,8	5,8		
68,6	-7,0	31,5	45,1	-6,3		
72,9	-3,5	7,1	69,3	3,2		
15,2	2,8	-0,5	1,4		3,7	Greene et al., 1983
14,7	4,0	-2,4	1,5		3,0	Ration der Tiere enthielt verschieden hohe Kaliummengen
14,3	2,2	-0,5	0,9		2,7	
14,4		16,9		3,1		Goetsch und Owens,
23,0		31,3		4,6		1985
27,7		30,9		4,1		Ration der Tiere bestand aus
63,6		110,2		8,3		88% Konzentrat
34,7	3,1	-1,0	-0,8	33,3	1,5	Greene et al., 1988
32,8	5,8	-2,7	-1,0	30,4	2,4	Ration enthielt Monensin
24,9	1,2	3,7	-3,9	23,9	0,2	Khorasani und Armstrong, 1992 Es wurden verschiedene Diäten verfüttert
25,1	1,8	2,5	0,1	20,7	3,5	
25,2	1,1	2,9	-1,4	22,6	2,1	
51,4	20,9	-0,8	-0,4	31,7	18,2	
48,2	14,5	1,4	0,5	31,8	17,4	
51,7	19,8	-3,3	-1,0	36,2	13,8	
33,6	1,6	-4,1	4,5	31,6	1,0	
37,1	5,4	-1,1	-0,2	33,0	4,4	
170,0	14,6	1,8		157,2	12,8	Rhanema et al., 1994 Ration der Tiere enthielt hohe Fettgehalte
189,8	6,8	6,6		176,5	13,9	
199,5	13,8	-13,1		198,7	0,7	
189,5	-13,3	27,9		174,9	14,6	
199,7	15,9	6,6		177,2	22,5	
18,0	-5,0	11,6		11,5	6,6	Zinn und Shen, 1996 Ration der Tiere enthielt hohe Fettgehalte
17,6	-5,9	12,9		10,6	7,0	
39,5	3,3	13,7		22,6	17,0	
40,3	-4,6	16,6		28,3	12,0	
17,8	-5,5	12,2		11,0	6,8	
39,9	-0,7	15,1		25,4	14,5	
28,8	-0,9	12,7		17,0	11,8	
28,9	-5,2	14,7		19,5	9,5	
231,0	49,8	24,6		156,5	74,4	Khorasani et al., 1997 Es wurden verschiedene Silagen verfüttert
150,0	19,1	28,0		107,4	40,9	
118,0	6,5	28,6		83,6	34,7	
115,0	-0,9	36,8		78,6	35,9	
		-14,8	-7,5			Singer, 2006
		-12,9	-6,3			
		-10,8	-9,0			
		-13,8	-12,6			

In Untersuchungen zur Vitamin D-abhängigen Ca-Absorption im Pansen zeigten sich Speziesunterschiede. So führte eine Ca-arme Fütterung bei Ziegen zur Induktion von hohen 1,25VitD-Serumkonzentrationen. Eine deutlichen Stimulierung der Ca-Fluxe im Pansen, wurde in Ussing-Kammer-Versuchen nachgewiesen³⁸. Im Gegensatz dazu konnte unter gleichen Bedingungen keine Stimulation im Pansen von Schafen festgestellt werden⁷³. Es kann davon ausgegangen werden, dass beim Wiederkäuer durch Ca-Absorption im präintestinalen Bereich des GIT, bei einem ausreichend hohem Ca Angebot in der Ration, der grösste Teil des täglichen Ca-Bedarfes gedeckt wird. Bei der Erhöhung von Ca in der Ration wird dieses überwiegend durch passive Transportmechanismen im präintestinalen Bereich des GIT aufgenommen.

1.8 Calciumrückresorption in der Niere

Die Niere spielt eine zentrale Rolle innerhalb der Ca-Homöostase. Einerseits dient sie als Ausscheidungsorgan für Ca, andererseits ist sie unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Quelle für die aktive Form von Vitamin D.

Die Nieren sind Hauptort für die Hydroxylierung von 25(OH)D₃ zu 1,25VitD. Die Reaktion wird durch ein mitochondriales Enzym (1- α -Hydroxylase) streng reguliert. Wie bereits im Kapitel Vitamin D (1.5.4.3) erwähnt, wird die renale Genexpression der 1- α -Hydroxylase durch PTH, geringe Konzentrationen von Ca und P im Blut stimuliert und durch 1,25VitD selbst gehemmt⁵. Aber auch der Insulin-like growth factor-I (IGF-I) beeinflusst die Aktivität des Enzyms. IGF-I erhöht die Insulinsensitivität, verbessert das Serumlipidprofil, zeigt eiweiss sparende Effekte, stimuliert die Nierenfunktion und den Knochenumsatz und beeinflusst positiv das kardiovaskuläre System. Wie unter Wachstumshormonen nehmen unter IGF-I-Gabe bei Ratte und Mensch glomeruläre Filtration und renaler Plasmafluss zu, Serumharnstoff und -kreatinin fallen ab⁸⁸. Nesbitt und Drezner⁸⁹ konnten bei einer Studie mit Mäusen nach einer IGF-I-Infusion einen dosisabhängigen maximalen Anstieg der 1- α -Hydroxylase nach 24 Stunden nachweisen.

Die Ca-Rückresorption in der Niere liegt aufgrund der Proteinbindung von Ca bei 50-60%. Der Hauptort der Resorption des filtrierten Ca ist der proximale Tubulus⁹⁰. Deutlich weniger wird in der Henle-Schleife und der geringste Anteil in den distalen Bereichen resorbiert⁵⁰. Der grösste Teil des Ca wird über den passiven parazellulären Weg resorbiert. Wie auch im Dünndarm gibt es in den distalen Tubuli einen aktiven 1,25VitD abhängigen Transportweg. Diese transzellulären Transport- und Regulationsmechanismen entsprechen denen im Dünndarm (siehe Kapitel 1.6.2).

Wie bei vielen anderen lebenswichtigen Inhaltsstoffen im Ultrafiltrat (Natrium, Kalium, Glucose) ist auch die tubuläre Resorption von Ca zwischen dem dicken aufsteigenden Schenkel, der Henleschleife und dem Sammelrohr hormonell beeinflussbar. In diesem Bereich wird die Ca-Resorption tierartlich unterschiedlich und bedarfsabhängig von PTH, 1,25VitD und CT reguliert⁹¹.

Die einzelnen Schritte des tubulären Transportes lassen sich, wie im Darm, in eine apicale Aufnahme, eine cytosolische Diffusion und die basolaterale Abgabe von Ca unterteilen. Für die energetisch begünstigte apicale Aufnahme von Ca sind spezifische Ca-Kanäle verantwortlich^{92,93}. In der Niere findet man vorwiegend den Ca-Kanal TRPV5³². In Studien mit TRPV5-KO-Mäusen zeigten diese Tiere eine starke Hypercalciurie, eine kompensatorische intestinale Ca-Hyperabsorption und eine reduzierte Knochendichte^{94,95}.

Bei der Diffusion von Ca durch das Tubulusepithel scheint das im Cytosol lokalisierte, 1,25VitD-abhängige Calb28k als Ca-Transporter zu agieren, der nur in den Nephronabschnitten vorkommt, die einen aktiven, transzellulären Ca-Transport aufweisen. Das überwiegend in der Darmmucosa vorkommende Calb9k ist auch in den Calb28k-exprimierenden und weiteren Tubulusepithelzellen nachweisbar⁹⁶. Diese CaBP sind in der Niere mit der basolateralen Membran assoziiert. Die genauen Funktionen sind noch unbekannt. Für den energieabhängigen basolateralen Ausstrom von Ca sind ein elektrogener $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und eine Ca-ATPase verantwortlich^{90,97}. Der $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wird fast nur in basolateralen Membranen und distalen Nephronen exprimiert. Die Ca-ATPase kommt dagegen in allen Nephronsegmenten vor⁶³. Beide Transportproteine scheinen durch 1,25VitD nicht aktivierbar zu sein⁹⁷.

Es wird davon ausgegangen, dass beim aktiven transzellulären Ca-Transport etwa 60% mit Hilfe des Austauschers und ca. 30% mit der Ca-ATPase die Epithelzellen verlassen⁹⁸.

1.9 Vitamin D-Rezeptor

1.9.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen

Vitamin D wirkt, wie auch andere Steroidhormone, über die Interaktion mit einem intrazellulären Rezeptor, dem Vitamin D-Rezeptor (VDR). Der VDR gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und entspricht in seiner Funktion den ligand-aktivierten, regulatorischen Transkriptionsfaktoren^{99,100}.

Grundsätzlich kommt der Rezeptor in zwei verschiedenen Formen vor, aktiviert und inaktiviert (= nicht von Liganden besetzt). Die aktivierte Form wurde hauptsächlich in den

Nuclei der Darmschleimhaut als ein chromosomales Protein entdeckt, das spezifisch Vitamin D bindet⁹⁹. Es wird angenommen, dass der VDR, wie andere Steroidhormonrezeptoren auch, ein locker gebundenes chromosomales Protein ist. Durch Anlagerung des Vitamin D an seinen Rezeptor wird die lockere Verbindung verstärkt. Gemäss Barsony et al.⁹⁹ wurden beim Menschen mittels fluoreszierender Liganden (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-1,25VitD) eine gewisse Menge VDR im Cytoplasma kultivierter Fibroblasten gefunden. Genauer betrachtet befanden sich die Rezeptoren im endoplasmatischen Reticulum, im Golgi-Komplex und in Assoziation mit den Mikrotubuli. Über die genaue Funktion des cytoplasmatischen Rezeptors ist man sich nicht ganz im Klaren. Möglich wäre, dass er nicht genomische (extranukleäre) Aufgaben übernimmt. Eine zusätzliche Regulierung des Ca-Transportes könnte beispielsweise eine schnelle Erhöhung des intrazellulären cGMPs (ein second messenger für die Signalweiterleitung in Zellen) sein.

Der VDR besitzt - je nach Spezies - ein Molekulargewicht zwischen 48 Kilodalton (kDa) und 60 kDa⁴⁵. Mittlerweile ist bekannt, dass der VDR neben dem Darm in weiteren Organen vorkommt, so z.B. in der Nebenschilddrüse, in den β -Zellen des Pankreas, in der Hypophyse, im Ovar, in den Sertolizellen der Tubuli seminiferi des Hodens, im Gesäuge, in der Plazenta, im Uterus und in der Haut. Des Weiteren konnte er in Brustkrebszellen, Melanomzellen, Lymphozyten des Menschen und in Osteosarkomzellen der Ratte nachgewiesen werden¹⁰¹.

1.9.2 Struktur und Funktion

Der VDR besteht aus einer Polypeptidkette mit verschiedenen funktionellen Domänen (Abb. 5, A). Am N-terminalen Ende ist eine DNA-Bindungsdomäne mit ihren „Zinkfingern“ lokalisiert. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Hormonbindungsdomäne. Da der Rezeptor nicht sehr stabil ist, zerfallen beide Bindungsstellen zeit- und temperaturabhängig¹⁰¹. Die stark konservierte DNA-Bindungsdomäne besitzt zwei Zinkfinger. Das bedeutet, eine charakteristische Aminosäuresequenz, in deren Abschnitt des Rezeptors sich zwei Strukturen befinden, die durch Anhäufungen der Aminosäure Cystein gekennzeichnet sind. Jeweils 4 Cysteinmoleküle, die durch ein Zinkatom fixiert sind, bilden den Grundstock für diese fingerähnliche Aminosäureschleife (Abb. 5, B). Diese Zinkfinger werden bei Inaktivität durch ein Protein verdeckt. Die ligand-bindende Domäne ist innerhalb des COOH-terminalen Bereiches lokalisiert und für die hohe Bindungsaffinität von 1,25VitD verantwortlich ($K_d = 10^{-10}$ bis 10^{-11} M)²³. 25(OH)D₃ und 24,25(OH)₂D₃ besitzen eine etwa 100-mal schwächere Bindungsaffinität¹⁰². Mittlerweile ist bekannt, dass das 1,25VitD-endokrine-System nicht nur die traditionellen Zielorgane Darm, Knochen und Nieren umfasst, sondern

dass auch in den β -Zellen des Pankreas, in der Hypophyse, in der Plazenta, im Ovar, in den Sertolizellen der Tubuli seminiferi des Hodens, im Gesäuge, in der Haut sowie in aktivierten B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Keratinozyten und vielen Tumorzellen VDR's vorkommen¹⁰³.

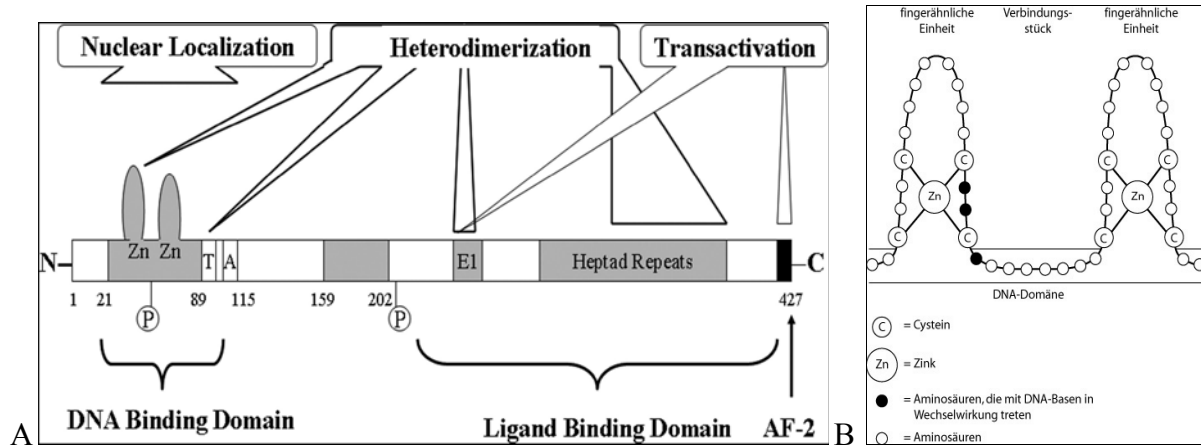


Abb. 5: A: funktionelle Domäne des humanen VDR¹⁰⁰ (Brown et al., 1999); B: DNA-Domäne des Vitamin-D-Rezeptors mit den Zinkfingern⁵ (Kaune, 2000)

Beim Huhn existiert der VDR im Darm in einer grösseren (60,3 kDa) und kleineren (58,6 kDa) Form¹⁰⁴. Von der kleineren Form wird angenommen, dass sie artifiziell als Resultat eines Abspaltungsprozesses entsteht¹⁰⁵. Diese Annahme stützt sich vor allem auf Beobachtungen von Allegretto et al.¹⁰⁶. Sie haben nachgewiesen, dass der VDR leicht von endogenen und exogenen Proteasen abgebaut wird. Vitamin D zirkuliert im Blut vorwiegend gebunden an das Vitamin D-bindende Protein. Weniger als 5 % des Hormons liegt in freier Form vor. Die ungebundene Form tritt durch einfache Diffusion in die Zellen ein und verbindet sich dort mit dem VDR¹⁰⁷. Dieser Komplex wird anschliessend phosphoryliert. Zudem kommt es zu einer Abspaltung des Proteins, dass die Zinkfinger des Rezeptors verdeckt. Dadurch kann sich das Protein mit einem nukleären Hilfsfaktor verbinden, welcher auch Retinoid-X-Rezeptor (RXR) genannt wird¹⁰⁸. Zusammen bilden sie ein VDR/RXR-Heterodimer. Dieses wiederum hat eine hohe Affinität zu einer spezifischen regulatorischen Sequenz der DNA, dem Vitamin D-Response-Element (VDRE), welches allen Vitamin D-abhängigen Genen vorgelagert ist. Das VDRE besteht stets aus zwei Abschnitten von jeweils sechs Nukleotiden, die in gleicher Orientierung oder Palindromanordnung, entweder ununterbrochen hintereinander liegen oder durch drei weitere Nucleotide getrennt sind. Das Andocken des VDR/RXR-Heterodimers an das VDRE bewirkt die Bindung der RNA-Polymerase an diesen Komplex und in der Folge die Transkription der 1,25VitD-abhängigen

Gene¹⁰⁷. Letztendlich verursacht 1,25VitD indirekt eine erhöhte Syntheserate bestimmter Proteine. Dies sind unter anderem 24-Hydroxylase, alkalische Phosphatase, Calbindin, Osteocalcin, Ca-ATPase und VDR selbst¹⁰⁹. Es handelt sich vorwiegend um Proteine, die für die Erhaltung der Ca-Homöostase in den klassischen Zielgeweben Darm, Knochen und Niere zuständig sind³⁴. Durch die Vermittlung der VDR werden die Zelldifferenzierung sowie die Zellproliferation erhöht und die Kollagensynthese gehemmt¹⁰⁹. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass 1,25VitD die Tumornekrosefaktor-induzierte Zytotoxizität auf humane Malignomzellen potenziert und dass 1,25VitD in verschiedenen Tumorzellen Apoptose induzieren kann. Des Weiteren stimuliert 1,25VitD die Makrophagendifferenzierung, verändert die T-Lymphozytenaktivität und beeinflusst die Sekretion einiger Peptidhormone, wie z.B. Prolactin und Insulin¹⁰¹. Rougui et al.¹¹⁰ konnte in der Epidermis, in der Niere und im Darm einen Einfluss von 1,25VitD und Ca auf die VDR-Expression zeigen. 1,25VitD beeinflusste in der Epidermis den VDR-Gehalt durch Neu-Synthese der VDR-mRNS. Im Darm wurde durch erhöhte Ca-Absorption die VDR-mRNS-Synthese stimuliert.

1.10 Calbindin D9k

1.10.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen

Einen Grundstein in der Vitamin D-Forschung legten Wassermann und Taylor¹¹¹, als sie erstmalig ein Vitamin D-abhängiges CaBP im Darm von Hühnern entdeckten. Das Protein definierte sich schnell als Calbindin und wurde kurze Zeit später auch im Darm von Ratten gefunden¹¹². Im Laufe der Zeit wurde es in weiteren Spezies und Geweben lokalisiert, bspw. in der Niere und den Knochen von Säugern, aber auch in Geweben, die nicht in den Ca-Haushalt des Organismus eingreifen (Pankreas, Plazenta, Uterus, Gehirn, Lunge, Innenohr und Retina). Die Familie der intrazellulären Calbindine umfasst Calb9k und Calb28k. Beide gehören wie Calmodulin, Parvalbumin, Troponin C und S100-Protein zu den CaBP mit einer hohen Affinität für Ca ($K_d = 10^{-8}$ - 10^{-6})¹¹³. CaBP lassen sich in Puffer und Sensoren einteilen. Puffer wie Parvalbumin wirken als passive "Stossdämpfer", die schnelle und starke Schwankungen der intrazellulären Konzentrationen an freiem Ca verhindern und somit dem Zellschutz dienen. Sensoren wie Calmodulin wirken dagegen als aktive Regler, die in second-messenger-Systemen eine grosse Rolle spielen. Sie modulieren direkte Ca-abhängige nachgeschaltete Signalkaskaden und greifen in vielfältiger Weise in die Zellfunktion ein. Calbindine lassen sich biochemisch in 2 Klassen einteilen. Calb9k mit einem Molekulargewicht von 9 kDa gehört zu den kleinsten CaBP und man findet es vorwiegend im

Darm von Säugern. Calb28k mit einem Molekulargewicht von 28 kDa ist in hohen Konzentrationen im Vogeldarm, aber auch in Darm, Niere, Gehirn, Uterus und Pankreas von Säugern und Vögeln nachweisbar¹¹⁴.

1.10.2 Struktur und Funktion

Die CaBP besitzen ein gemeinsames Merkmal, eine oktaedrische Ca-bindende Struktur, die durch eine Helix-Loop-Helix-Anordnung der Polypeptidkette (sog. EF-Hand) entsteht. Der Name der EF-Hand-Proteinfamilie leitet sich von der molekularen Struktur der Ca-Bindungsdomäne ab. Erstmals wurde dies an Parvalbumin, einem 12 kDa großen Karpfenmuskelprotein röntgenkristallographisch analysiert. Zwei α -Helices, E und F, sind durch eine Schleife aus 12 Aminosäuren (Ca-bindende Struktur) miteinander verbunden. Diese Helices sind so angeordnet, dass sich die N-terminal gelegene Helix als Zeigefinger, die Schleife als gekrümmter Mittelfinger und die C-terminale F-Helix als Daumen der rechten Hand darstellen lassen¹¹⁵ (Abb. 6).

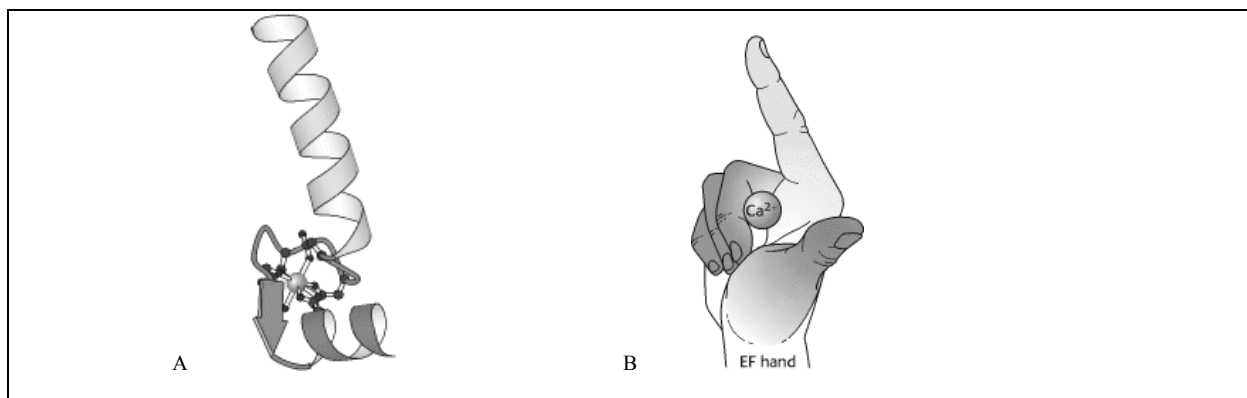


Abb. 6: A: Struktur, Die Sequenzanalyse zeigt eine einzelne Polypeptidkette bestehend aus Aminosäuren; B: EF Hand¹¹⁶

Calb9k besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 78 Aminosäuren. Es besitzt vier Haupt-Helices mit Ca-bindenden Schleifen zwischen Helices I und II und zwischen Helices III und IV, somit zwei EF-Händen. Im Gegensatz dazu besitzt das Calb28k sechs Ca-bindende Domänen (EF-Hände). Dabei enthalten nur vier der sechs EF-Hände die für die hohe Ca-Bindungsaffinität nötige Anzahl und Position der sauerstoffhaltigen Aminosäuren (bspw. Alanin, Glycin)¹¹⁷. Die zwei anderen Domänen scheinen im Laufe der Evolution ihre Ca-Bindungsaktivität verloren zu haben. Da beide Calbindine über die gesamte Evolution erhalten geblieben sind, scheinen sie eine wesentliche und bedeutende Rolle im Organismus zu spielen, aber bis heute ist das noch nicht vollständig geklärt.

Auch wenn keine Sequenzhomologie der Aminosäuren erkennbar ist, haben Calb9k und Calb28k Gemeinsamkeiten. Sie sind in den meisten Geweben Vitamin D-abhängig (außer im Gehirn), zeigen Hitzestabilität und ihr isoelektrischer Punkt befindet sich im sauren Bereich ($\text{pH} \approx 4,7$). Festzuhalten ist, dass Antikörper gegen Calb9k und gegen Calb28k weder Kreuzreaktionen mit anderen Ca-bindenden Proteinen noch untereinander zeigen¹¹⁵. Es gibt bisher viele Studien, die Calbindine näher erforschen, aber die letztendliche Funktion innerhalb des Ca-Haushaltes ist noch nicht vollständig geklärt. Calb28k scheint ein phylogenetisch altes Protein zu sein, da es im distalen Nierenkonvolut von Amphibien und Reptilien nachweisbar ist. So liegt die Vermutung nahe, dass es schon lange eine wesentliche Rolle in der Regulation der intrazellulären Ca-Homöostase spielt. Das Protein lässt sich auch im Gehirn von Fischen identifizieren, nicht aber in deren Darm oder Niere¹¹⁸. Vermutlich agierte Calbindin ursprünglich als neuronales Protein und seine Präsenz in anderen Geweben ist eine Erscheinung in der Entwicklung höherer Spezies. Die Vitamin D-Abhängigkeit in Darm und Niere und die Expression des Calbindin-Gens wird durch 1,25VitD reguliert, wohingegen sich im Gehirn von Ratte und Vogel eine Vitamin D-Unabhängigkeit zeigte¹¹⁹. Calbindine wurden mittlerweile in verschiedenen Spezies und Geweben nachgewiesen. Hier wird hauptsächlich auf Forschungsergebnisse in den Organsystemen Darm und Niere eingegangen.

1.10.3 Calbindin im Darm

Es wurde bereits ausgeführt, dass es Wassermann und Taylor¹¹¹ waren, die im Darm des Vogels Calbindin und seine Vitamin D-Abhängigkeit feststellten.

Es ist möglich, dass 1,25VitD in jede der drei Phasen der intestinalen Ca-Absorption eingreift. Die aktive Ca-Absorption und die biologische Rolle des Vitamin D-Hormons ist heute gut erforscht³². Im bovinen Intestinaltrakt herrscht das Calb9k vor¹²⁰. Calbindin bindet die Ca-Ionen reversibel nach deren Aufnahme in das Cytoplasma der Enterozyten und transportiert sie zur basolateralen Seite. Durch die Bindung der Ca-Ionen an Calbindin wird Zellapoptose verhindert, welche sonst durch einen Anstieg der intrazellulären, freien Ca-Ionen ausgelöst würde¹²¹. Die Calbindin-Synthese wird maßgeblich durch 1,25VitD stimuliert¹²².

Ratten aus einer Vitamin D-freien Zucht zeigten nach einer einmaligen Injektion von 1,25VitD (650pmol/100g KGW i.p.) eine Verdopplung der Calb9k-mRNA im Duodenum¹²³. In der Niere von Vitamin D-defizienten Ratten konnten Varghese et al.¹²⁴ nach einer einmaligen Injektion von 1,25VitD (200ng/100g KGW i.p.) einen deutlichen Anstieg von Calb28k-mRNA nachweisen. Eine Untersuchung von Christakos et al.¹²⁵ zur Regulation der

Calbindin-Genexpression wurde mit einer Vitamin D-freien und Ca-armen Diät (0,02% Ca und 0,42% P) mit 3-Wochen alten Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden 7 Tage lang mit 1,25VitD (25ng/Tag; i.p.) behandelt und mit einem Endgewicht von 250 - 300g wurden Veränderungen der mRNA-Spiegel von Calbindin und VDR in der Niere und im Darm gemessen. Im Darm zeigten sich ein deutlicher Anstieg der Calb9k-mRNA und eine unveränderte VDR-mRNA. In der Niere erhöhte sich der Gehalt an Calb28k-mRNA und die VDR-mRNA blieb unverändert. Bei Ratten mit einer Vitamin D-angereicherten Diät zeigte sich nach der gleichen 7-tägigen Behandlung mit 1,25VitD (25ng/Tag, i.p.) eine Induktion der Calbindin-Genexpression und der VDR-mRNA im Darm und in der Niere. Die Ergebnisse bei Vitamin D- und Ca-Mangel-Ratten lassen die Präsenz eines Inhibitors innerhalb einer gesteigerten 1,25VitD-abhängigen Rezeptor-Expression vermuten¹²⁵.

Bei Calb28k-KO-Mäusen konnten keine calcämischen Abnormalitäten festgestellt werden¹²⁶. VDR-KO-Mäuse zeigten dagegen Hypocalcämie, sekundären Hyperparathyoidismus, Rachitis und eine zu 90% verringerte renale Expression von Calb9k nicht aber von renalem Calb28k. VDR/Calb28k-Doppel-KO-Mäuse entwickelten einen schweren sekundären Hyperparathyreoidismus und rachitische Skelettveränderungen. Eine Ca- und Laktose-angereicherte Diät konnte nur zu einem geringen Teil die klinisch manifestierte Rachitis korrigieren. So waren die Autoren der Meinung, dass auch Calb28k eine grosse Rolle innerhalb der Ca-Homöostase spielt und Calb9k kompensatorisch Einfluss nehmen kann¹²⁷. Eine jüngere Studie von Kutuzowa et al.¹²⁸ zeigten keine phänotypischen Veränderungen und auch keine Abweichungen im Serum-Ca-Spiegel bei Calb9k-KO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Darüber hinaus waren Calb9k-KO-Mäuse in der Lage, als Reaktion auf 1,25VitD, Ca aus dem Darm zu absorbieren. Das könnte bedeuten, dass Calb9k für die intestinale Vitamin D-abhängige Ca-Absorption nicht notwendig ist¹²⁸.

In adulten VDR-KO-Mäusen war die intestinale Calb9k-Expression verglichen mit den Wildtyp-Mäusen um 90% sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene verringert¹²⁹. Bolt et al.¹³⁰ untersuchten in einer Studie mit Mäusen den Effekt einer Ca-reichen Diät auf die Expression von Calb9k und Calb28k in An- und Abwesenheit von VDR. Die Behandlung der Wildtyp-Mäuse mit der Diät unterdrückte die intestinale Calb9k-Expression signifikant auf mRNA- und Proteinebene. Dagegen blieb die Expression von Calb28k im Darm bei den VDR-KO-Mutanten und den Wildtyp-Mäusen unter der Ca-reichen Diät unbeeinflusst. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Ca die Calb9k-Expression durch Veränderung des zirkulierenden 1,25VitD reguliert und dass der VDR, bei einer induzierten Unterdrückung durch eine Ca-reiche Diät, für die Calb9k-Expression nötig ist.

Eine weitere Studie mit Calb9k-KO-Mäusen zeigte, dass Calb9k keine Bedeutung für die 1,25VitD-abhängige Ca-Absorption im Darm hat. Die Mäuse wurden Ca-arm gefüttert und 4 Tage lang mit 1,25VitD (50ng i.p.) behandelt. Sie waren sehr gut in der Lage Ca aus dem Darm zu absorbieren. Es wird vermutet, dass andere Proteine den Defekt von Calb9k korrigieren¹³¹.

In einer aktuellen Studie konnten Benn et al.²² an TRPV6-KO-Mäusen, Calb9k-KO-Mäusen und TRPV6/Calb9k-Doppel-KO-Mäusen zeigen, dass trotz Abwesenheit von Calb9k und TRPV6 ein intestinaler aktiver Ca-Transport stattfindet. Allen Mäusen wurde eine Ca-arme Diät verabreicht und es konnte bei allen drei KO-Mäusemutanten und den Wildtyp-Mäusen ein Anstieg im duodenalen Ca-Transport festgestellt werden. Dagegen konnten keine Unterschiede im Ileum dargestellt werden. Beim Vergleich Ca-arm ernährter TRPV6-KO Mäuse mit Wildtyp-Mäusen konnte ein signifikanter Rückgang des aktiven intestinalen Ca-Transportes gezeigt werden. Dies lässt darauf schließen, dass TRPV6 Teil des aktiven Ca-Transports im Darm ist, dass aber Mäuse ohne TRPV6 und ohne Calb9k einen aktiven Ca-Transport aufweisen. Des Weiteren erhielten Ca-arme und Vitamin D-frei ernährte KO-Mäuse 3 mal innerhalb von 48 Stunden eine Injektion mit 1,25VitD (100ng/100g KGW). Auch hier konnte wiederum ein signifikanter Anstieg im duodenalen Ca-Transport festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass ein Mangel an Calb9k durch andere Faktoren kompensiert werden kann und es möglich ist, dass weitere Ca-Kanäle und CaBP innerhalb der intestinalen Ca-Absorption eine Rolle spielen²².

Bis heute ist im Darm das genaue Zusammenwirken von Calb9k/28k mit der aktiven Form von Vitamin D nicht ganz geklärt. Es lassen sich nur Vermutungen aufstellen, die Zellintoxikationen verhindern. Dies wären eine Beteiligung an der Regulation der Ca-Homöostase, eine erleichterte Ca-Diffusion durch die Enterozyten, das Agieren als eine Art Kern-Regulator oder das Auftreten als Ca-Puffer.

1.10.4 Calbindin in der Niere

Hauptaufgabe des Vitamin D in der Niere ist die Erhaltung der Ca-Homöostase durch Steigerung der renalen Rückresorption. Inwieweit Calb9k und -28k daran beteiligt sind, ist bislang unklar. Einige Studien lassen Vermutungen über deren Funktion aufstellen. Bei Säugern wurden relativ hohe Konzentrationen an Calb9k und Calb28k in den distalen Tubuli und den Sammelrohren nachgewiesen. Immunocytochemische Studien belegen, dass sich beide Formen von Calbindin bei einer Anfärbung meist in denselben Zelltypen (tubuläre Rückresorption) befinden¹³². Die Lokalisationen sind im Cytoplasma und Kern der jeweiligen

Zelle und stehen daher nicht in Verbindung mit den Membranen. Dies lässt vermuten, dass sie nicht am Ca-Transport durch die Plasmamembran, sondern wie auch im Darm, am Transport durch die Zelle beteiligt sind¹¹⁵. Ca gelangt durch die apicale Plasmamembran in die Zelle, diffundiert durch das Cytosol und wird aktiv auf der gegenüberliegenden basolateralen Membran ausgeschleust^{91,133}. Es ist seit langem erforscht, dass die Expression des Calbindins durch die aktive Form des Vitamin D induziert wird³⁴. Auch die Existenz des VDR's in der Niere ist seit langem bekannt³⁴. Vitamin D-Mangel führt zu einer Verringerung der Ca-Absorption und zu einem Anstieg des stimulatorischen Effekts von PTH auf die Ca-Absorption¹³⁴. Calb9k/28k sind in den Zellen der tubulären Ca-Rückresorption lokalisiert und scheinen dementsprechend bei diesem Vorgang eine wesentliche Rolle zu spielen. Eine weitere funktionelle Überlegung ist die Aufgabe des Calbindins als intrazellulärer Ca-Puffer in den distalen Tubuli. Der intrazelluläre Puffer wird durch die Komplexbildung zwischen Ca und Calbindin repräsentiert und könnte so für ein Ca-Gleichgewicht innerhalb der Zelle sorgen und eventuelle metabolische Entgleisungen mit nachfolgendem apoptotischen Zelltod verhindern¹¹⁵. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich bei den Calb28k-KO-Mäusen, die über einen Zeitraum von 4 Wochen mit einer Ca-reichen Diät gefüttert wurden, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ein 2-3mal höherer Ca-Gehalt im Harn nachweisbar war. Es wurden keine Veränderungen von Ca, PTH, Magnesium oder von P im Harn und Serum festgestellt¹³⁵. Im Hinblick auf die mRNA- und Proteinspiegel des Calb9k in der Niere zeigten die Calb28k-KO-Mutanten Mäuse unter einer Ca-armen Diät einen deutlichen Anstieg. Aber auch die Wildtypen wiesen diesen Anstieg auf. Somit ist ein kompensatorischer Anstieg des Calb9k aufgrund des fehlenden Calb28k auszuschliessen. Im Gegensatz dazu ist der Gehalt des Calb28k, bei unterschiedlichem Ca-Gehalt im Futter, stets unverändert geblieben. Daraus kann gefolgert werden, dass beide Proteine eine unterschiedliche Funktion in der Niere erfüllen¹³⁵. Dass der Ca-Spiegel im Serum bei Ca-reicher Diät unbeeinflusst bleibt, spricht für einen Anstieg der intestinalen Ca-Absorption oder für einen hohen 'Bone Turnover' der KO-Tiere. Diese in vivo-Daten lassen vermuten, dass Calb28k eine wesentliche Rolle in der renalen Ca-Absorption spielt¹³⁵. Bei VDR-KO-Mäusen lässt sich eine Hypocalcämie zusammen mit einer 90%igen Reduktion der Calb9k-Expression in der Niere feststellen. Dabei ist aber die Expression des Calb28k nahezu unverändert geblieben¹²⁹. Um ein vollständiges Fehlen des Calbindins zu gewährleisten wurden VDR/Calb28k-Doppel-KO-Mäuse generiert und untersucht. Sowohl bei den VDR-KOs als auch bei den Doppel-KOs war die Ca-Exkretion im Harn 2–3mal höher als bei den Wildtypen, was den Verdacht eines Defekts der renalen Ca-Resorption bei VDR- und Doppel-KO-Mäusen bestätigt¹²⁷. Es besteht

auch eine deutliche Differenz zwischen Calb9k und Calb28k im Hinblick auf den zeitlichen Ablauf der Gen-Expression. Nach einmaliger Gabe von 1,25VitD (200ng/100g KGW i.p.) bei Vitamin D-frei ernährten und im Dunkeln gehaltenen Mäusen erreichte die Induktion der renalen Calb28k-mRNA 12 Stunden nach der Injektion ihren Peak. Die des Calb9k erreichte erst 24 Stunden nach der Injektion ihren renalen Peak. Im Darm zeigte sich diese verzögerte Antwort des Calb9k auf das Hormon nicht. Es wurde ein einheitlicher Peak 24 Stunden nach der Injektion nachgewiesen¹³⁶. Ursachen sind vermutlich die unterschiedlichen Funktionsweisen der beiden Proteine in diesen Geweben. Das genaue Zusammenspiel von 1,25VitD und Calb9k/28k in der Niere bleiben unklar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Calb9k und -28k in Verbindung mit 1,25VitD eine entscheidende Rolle in der renalen Ca-Rückresorption und dem transzellulären Ca-Transport in der Niere spielen. Die genaue molekulare Wirkungsweise ist allerdings bis heute noch nicht klar definiert ist und bedarf weiterer Studien in diesem Bereich.

1.11 VDR und Calbindin beim Wiederkäuer

Der Hauptanteil der Ca-Absorption beim Wiederkäuer findet trotz Vormagensystem im oberen Dünndarm statt¹³⁷. Sowohl der passive parazelluläre als auch der aktive transzelluläre Transport sind für das Rind beschrieben²⁰.

Der VDR ist eine wichtige Stellgröße der Ca-Homöostase im Intestinaltrakt, weshalb die VDR-Gehalte ätiologisch und pathogenetisch für das Entstehen der Gebärparese von Bedeutung sind. Bereits 1990 zeigte die Arbeitsgruppe um Horst und Goff, dass der VDR-Gehalt mit dem Alter abnimmt¹¹. Die intestinalen VDR-Konzentrationen verändern sich auch innerhalb eines Reproduktionszyklus der Kühe. In Trächtigkeit und Hochlaktation wurden höhere VDR-Gehalte festgestellt als zum Zeitpunkt der Geburt^{20,138,139}. Ein Vergleich der intestinalen Rezeptorenzahlen von Jersey- und Holsteinkühen ergab, dass Kühe der Rasse Jersey geringere Konzentrationen aufweisen⁴¹. Mit dem Alter vermindert sich auch der VDR-Gehalt auf den Osteoblasten²⁰.

Die Vitamin D abhängige Ca-Absorption wurde durch den Nachweis von VDR und Calb9k im Dünndarm von Ziegen bestätigt^{140,141}. Schröder et al.⁷³ wiesen VDR- und Calb9k-mRNA im Jejunum von Schafen nach. Auch Wilkens¹⁴² konnte Calb9k auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR beim Schaf nachweisen. Dabei konnte durch immunhistochemische Untersuchungen eine Kolo-kalisation mit TRPV5 und TRPV6 in den Enterozyten des proximalen Dünndarms festgestellt werden¹⁴². Die beiden epithelialen Ca-Kanäle sind bei negativen Membranpotenzialen und niedrigen intrazellulären Konzentrationen an freien Ca-

Ionen konstitutiv geöffnet¹⁴³. Aus diesem Grund kann es theoretisch nur zu einem bedeutsamen Ca-Influx kommen, wenn intrazellulär eine ausreichende Pufferkapazität für Ca-Ionen besteht⁴⁸. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass im Dünndarm des Schafes das gleiche System für den aktiven, transepithelialen Ca-Transport wie beim monogastrischen Tier vorhanden ist. Wie Tabelle 3 zeigt, konnten im Duodenum Calb9k¹²⁰, VDR und PMCA¹⁴⁴ von Wiederkäuer isoliert werden. Die Hypothesen stützen die Forschungsergebnisse bei Kühen, dass die intramuskuläre Verabreichung von 1,25VitD die intestinale Absorption steigert und einen Anstieg von Ca im Plasma verursacht^{145,146}.

Tab. 3: Übersicht des transzellulären Ca-Transportes im GIT von Wiederkäuern (auf RNA- oder Proteinebene); VDR: Vitamin D Rezeptor, TRPV5/6: epitheliale Ca-Kanäle; PMCA: membranständige Ca-ATPase; +: vorhanden, -: nicht vorhanden, n. u.: nicht untersucht; (modifiziert nach Wilkens¹⁴²)

Spezies	Gewebe	VDR	TRPV5	TRPV6	Calbindin	PMCA
Ziege	Pansen	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
	Dünndarm	+ ^{141,147,148}	* +		¹⁴⁰ +	n. u.
	Colon	+ ^{17,141,148}	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
Schaf	Pansen	⁷³ +	n. u.	n. u.	⁷³ -	n. u.
	Dünndarm	^{73,148} +	n. u.	n. u.	⁷³ +	n. u.
	Colon	^{17,73,148} +	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
Rind	Pansen	¹⁴⁹ -	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
	Dünndarm	^{144,150} +	n. u.	n. u.	^{120,144} +	¹⁴⁴ +
	Colon	^{41,150} +	n. u.	n. u.	¹²⁰ -	n. u.

*Huber, unveröffentlichte Ergebnisse, ohne Unterscheidung zwischen TRPV5 und TRPV6

Wilkens¹⁴² konnte Calb9k immunhistochemisch im Labmagen und Pansen nachweisen, die Reaktion war aber deutlich geringer als im Dünndarm oder den Nieren. Anhand dieser Ergebnisse scheint ein aktiver Transportmechanismus eher unwahrscheinlich. Die Labmagenwand ist für Ca permeabel und eine passive Absorption ist durch den dort vorherrschenden niedrigen pH-Wert (Ca liegt daher in seiner resorbierbaren Form vor) durchaus möglich¹⁵¹. Im Pansen konnten bisher weder epitheliale Ca-Kanäle noch Calbindine nachgewiesen werden¹⁴².

1.12 Grundprinzipien der Immunhistochemie

Ziel der Immunhistologie ist es, antigene Strukturen von Zellen und Geweben durch spezifische Antikörper zu identifizieren und darzustellen. Den Grundstein der Immunhistologie legte Coons¹⁵² durch die Verwendung Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper. Seitdem wurden Sensitivität und Spezifität erheblich verbessert und weitere Markersubstanzen wie verschiedene Enzyme (u.a. Peroxidase, alkalische Phosphatase), partikuläres Material (z.B. Goldpartikel) und Isotope etabliert. Heute spielen immunhistochemische Färbemethoden in der medizinischen Forschung und Diagnostik eine unentbehrliche Rolle. Wichtige Voraussetzung für die Qualität der Färbung sind die Spezifität der Antikörper und die Stabilität der Antikörper-Bindungsstellen auf Antigenen (Epitope, Determinanten). Die Stabilität wird durch den chemischen Aufbau und die Vorbehandlung des Gewebes bestimmt. Es kommen poly- und monoklonale Antikörper sowie Detektionssysteme aus verschiedenen Antikörper-Farbstoff-Kombinationen zum Einsatz. Monoklonale Antikörper werden aus einem einzelnen Plasmazellklon gewonnen. Diese entstehen durch Verschmelzen von Myelomzellen mit B-Lymphozyten. Die gebildeten Antikörper richten sich, im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern, nur gegen ein einziges Epitop eines Antigens. Somit sind monoklonale Antikörper hoch spezifisch. Sie besitzen allerdings gegenüber polyklonalen Antikörpern eine geringere Sensitivität und Stabilität. Ferner unterscheidet man nach der Anzahl der eingesetzten Antikörpersysteme direkte und indirekte Methoden (Abb. 7). Bei der direkten Methode ist der Farbstoff direkt an den Antikörper gebunden, der auch an das Antigen bindet. Die Verwendung eines Systems aus Primär- und Sekundärantikörpern nennt man indirekte Methode. Sie ermöglicht eine Steigerung der Sensitivität der Färbung (grössere Anzahl der Enzymmoleküle). Zur optischen Darstellung der so entstandenen Antigen-Antikörper-Verbindung bedarf es schließlich noch eines Enzymsystems. Die höchste Sensitivität zeigt dabei die Avidin-Biotin-Methode.

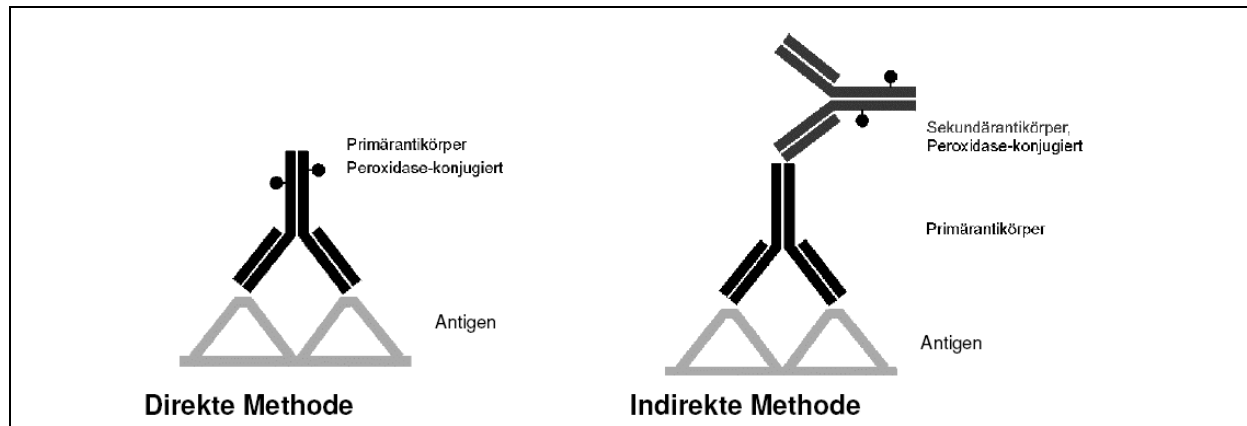


Abb. 7: Immunhistochemische Methoden¹⁵³

Die in unserer Untersuchung gewählte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) (Abb. 8) macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zu nutze, welche bis eine Million mal stärker als bei einer gewöhnlichen Antigen-Antikörper-Bindung sein kann und somit fast irreversibel ist.

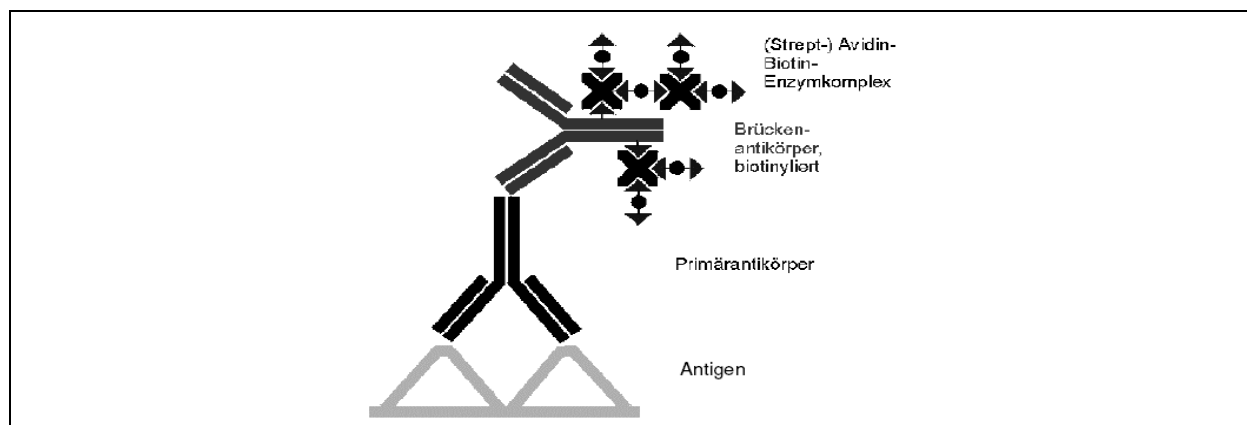


Abb. 8: ABC-Methode¹⁵³

Das Glykoprotein Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin, welches sich einerseits mit diversen Proteinen (z.B. sekundärer Antikörper) inklusive Enzymen (z.B. Meerrettichperoxidase) konjugieren lässt. Diese Eigenschaften können zur Bildung makromolekularer Komplexe bestehend aus durch Avidin quervernetzter biotinylierter Peroxidase genutzt werden. Obwohl die dreidimensionale Struktur des Avidins noch nicht ganz verstanden ist, ist klar, dass mindestens eine Biotinbindungsstelle pro Komplex frei bleibt. Diese Bindungsstelle ist es, die an den biotinylierten sekundären Antikörper bindet und somit die für die Farbreaktion wichtigen Enzyme in unmittelbare Nähe zu den Antigenen bringt.

2 Literaturverzeichnis

1. Vollmerhaus B, Roos H: Speiseröhre, Magen, Darm, Darmanhangsdrüsen. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Bd II Eingeweide, Nickel R, Schummer A, Seiferle E (Hrsg) 8. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1999
2. Püschner A, Simon O: Grundlagen der Tierernährung. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1988
3. Liebich HG: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Aufl, Schattauer Verlag, Stuttgart. 2004
4. Vollmerhaus B: Harn- und Geschlechtsapparat. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II Eingeweide, Nickel R, Schummer A, Seiferle E (Hrsg) 8. Aufl., Parey Buchverlag, Berlin, 1999
5. Kaune R: Knochenstoffwechsel. Physiologie der Haustiere, von Engelhardt W, Breves G (Hrsg), Enke Verlag, Stuttgart, 2000
6. Kraft W: Skelettmuskulatur, Knochen, Kalzium-, Phosphor-, Magnesiumstoffwechsel. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Kraft W and Dürr UM, Schattauer GmbH, Stuttgart, New York, 1999
7. Kessler J: Milchziegen bedarfsgerecht füttern. Agroscope Liebefeld-Posieux 16:1-4, 2004
8. Haenlein GF: Mineral nutrition of goats. J Dairy Sci 63:1729-1748, 1980
9. Oetzel GR: Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock. Vet Clin N Am Food Anim Pract 4:351-364, 1988
10. Liesegang A, Eicher R, Sassi ML, et al: Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. J Dairy Sci 83:1773-1781, 2000
11. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. Endocrinology 126:1053-1057, 1990
12. Liesegang A, Sassi ML, Risteli J, et al: Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. J Dairy Sci 81:2614-2622, 1998
13. Behrens H: Lehrbuch der Schafkrankheiten. 4 Aufl, Parey Verlag, Berlin, 2001
14. Yamagishi N, Oishi A, Sato J, et al: Experimental hypocalcemia induced by hemodialysis in goats. J Vet Med Sci 61:1271-1275, 1999
15. Seyedmehdi M, Heath AM, Pugh DG: Sheep and Goat Medicine, Feeding and nutrition, Pugh DG (Hrsg.), Saunders, Philadelphia. 2002
16. Tschuor AC, Riond B, Braun U, et al: Hämatologische und klinisch-chemische Referenzwerte für adulte Ziegen und Schafe. SAT 150:287-295, 2008
17. Lüthi S: Auswirkung einer erhöhten Calciumzufuhr auf Mineralstoffhaushalt und Knochenstoffwechsel bei Schaf und Ziege im peripartalen Zeitraum. Dissertation (in Druck), Institut für Tierernährung, Vetsuisse Fakultät, Zürich, 2009

18. Liesegang A, Risteli J, Wanner M: The effects of first gestation and lactation on bone metabolism in dairy goats and milk sheep. *Bone* 38:794-802, 2005
19. Matthews J: Nervous diseases. *Diseases of the goat*, Matthews J (Hrsg), 2. Aufl, Blackwell Science, Oxford, 1999
20. Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL: Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J Dairy Sci* 74:4022-4032, 1991
21. DeLuca HF: Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80:1689S-1696S, 2004
22. Benn BS, Ajibade D, Porta A, et al: Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k. *Endocrinology* 149:3196-3205, 2008
23. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F8-F28, 2005
24. Holick MF, Frommer JE, McNeill SC, et al: Photometabolism of 7-Dehydrocholesterol previtamin D3 in skin. *Biochem Biophys Res Commun* 76, 1977
25. Hollis BW, Wagner CL, Kratz A, et al: Normal serum vitamin D levels. *N Engl J Med* 352:515-516, 2005
26. Meyer H, Zentek J: Ernährung des Hundes: Grundlagen, Fütterungspraxis, Diätetik, Energie und Nährstoffe - Stoffwechsel und Bedarf. 5. Aufl, Parey Verlag, Stuttgart, 2005
27. Morris JG: Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol-D7-reductase. *J Nutr*:903-908, 1999
28. Erben RG: Knochen und Calciumhomöostase. *Physiologie der Haustiere*, von Engelhardt W, Breves G (Hrsg), 2. Aufl, Enke Verlag, Stuttgart, 2005
29. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, et al: Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 84:18-28, 2006
30. Holick MF: The influence of vitamin D on bone health across the life cycle. *J Nutr* 135:2726S-2727S, 2005
31. Holick MF, Chen TC: Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87:1080S-1086S, 2008
32. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ: Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373-422, 2005
33. Panda DK, Miao D, Bolivar I, et al: Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 279:16754-16766, 2004
34. Haussler MR: Vitamin D receptors: nature and function. *Annu Rev Nutr* 6:527-562, 1986
35. Breves G, Schröder B: Vergleichende Aspekte der gastrointestinalen Calcium-Umsetzungen beim Schwein und Wiederkäuer. *Lohmann Information* 2:1-3, 2005
36. Wassermann RH: Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J Nutr* 134:3137-3139, 2004

37. Schröder B, Hattenhauer O, Breves G: Phosphate transport in pig proximal small intestines during postnatal development: lack of modulation by calcitriol. *Endocrinology* 139:1500-1507, 1998
38. Schröder B, Rittmann I, Pfeffer E, et al: In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *J Comp Physiol [B]* 167:43-51, 1997
39. Pérez AV, Picotto G, Carpentieri AR, et al: Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion* 77:22-34, 2008
40. Bronner F, Pansu D: Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr* 129:9-12, 1999
41. Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL: Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 78:2388-2394, 1995
42. Goff JP, Horst RL: Calcium salts for treating hypocalcemia: carrier effects, acid-base balance, and oral versus rectal administration. *J Dairy Sci* 77:1451-1456, 1994
43. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J Dairy Sci* 77:1936-1951, 1994
44. Wassermann RH, Fullmer CS: Calcium Transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Annu Rev Physiol* 45:375-390, 1983
45. Bronner F: Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr* 117:1347-1352, 1987
46. Karbach U: Paracellular calcium transport across the small intestine. *J Nutr* 122:672-677, 1992
47. Fullmer CS: Intestinal calcium absorption: calcium entry. *J Nutr* 122:644-650, 1992
48. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ: TRPV5 and TRPV6 in $\text{Ca}(2+)$ (re)absorption: regulating $\text{Ca}(2+)$ entry at the gate. *Pflugers Arch* 451:181-192, 2005
49. Hoenderop JG, Kemp AWvd, Hartog A, et al: The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 261:488-492, 1999
50. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ: Molecular mechanism of active Ca^{2+} reabsorption in the distal nephron. *Annu Rev Physiol* 64:529-549, 2002
51. Peng JB, Chen XZ, Berger UV, et al: Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 274:22739-22746, 1999
52. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Nilius B, et al: (Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *Pflugers Arch* 446:401-409, 2003
53. van de Graaf SF, Hoenderop JG, Bindels RJ: Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1295-1302, 2006
54. Bouillon R, van Cromphaut S, Carmeliet G: Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem* 88:332-339, 2003
55. van Abel M, Hoenderop JG, Dardenne O, et al: 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 13:2102-2109, 2002

56. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, et al: Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G78-85, 2003
57. van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, et al: Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13324-13329, 2001
58. Bianco SD, Peng JB, Takanaga H, et al: Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the TRPV6 calcium channel gene. *J Bone Miner Res* 22:274-285, 2007
59. Christakos S, Liu Y: Biological actions and mechanism of action of calbindin in the process of apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:401-404, 2004
60. Centeno VA, Diaz de Barboza GE, Marchionatti AM, et al: Dietary calcium deficiency increases Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} extrusion mechanisms in chick enterocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 139:133-141, 2004
61. Ghijsen WE, Jong MDd, Os CHV: Kinetic properties of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in basolateral plasma membranes of rat small intestine. *Biochim Biophys Acta* 730:85-94, 1983
62. Dong H, Sellers ZM, Smith A, et al: $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange regulates Ca^{2+} -dependent duodenal mucosal ion transport and HCO_3^{-} secretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G457-465, 2005
63. Hoenderop JG, Hartog A, Stuiver M, et al: Localization of the epithelial Ca^{2+} channel in rabbit kidney and intestine. *J Am Soc Nephrol* 11:1171-1178, 2000
64. Martens H: Resorptionsvorgänge, Physiologie der Haustiere, von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), 2. Aufl, Enke Verlag, Stuttgart. 2005
65. Phillipson AT, Storry JE: The absorption of calcium and magnesium from the rumen and small intestine of the sheep. *J Physiol* 181:130-150, 1965
66. Ben-Ghedalia D, Tagari H, Geva A: Absorption by sheep of calcium, phosphorus and magnesium from a poultry litter supplemented diet. *J Agric Sci Camb* 98:85-88, 1982
67. Dillon J, Scott D: Digesta flow and mineral absorption in lambs before and after weaning. *J Agric Sci Camb* 92, 1979
68. Grace ND, Ulyatt MJ, Macrae JC: Quantitative digestion of fresh herbage by sheep: III. The movement of Mg, Ca, P, K and Na in the digestive tract. *Journal Agric Science Camb* 82:321-330, 1974
69. Greene LW, Fontenot JP, Webb KE: Site of magnesium and other macromineral absorption in steers fed high levels of potassium. *Journal of Animal Science* 57:503-510, 1983
70. Pfeffer E, Thompson A, Armstrong DG: Studies on intestinal digestion in the sheep. 3. Net movement of certain inorganic elements in the digestive tract on rations containing different proportions of hay and rolled barley. *Br J Nutr* 24:197-204, 1970
71. Rayssiguier Y, Poncet C: Effect of lactose supplement on digestion of lucerne hay by sheep. II. Absorption of magnesium and calcium in the stomach. *J Anim Sci* 51:186-192, 1980
72. Breves G, Holler H, Packheiser P, et al: Flux of inorganic phosphate across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. *Q J Exp Physiol* 73:343-351, 1988

73. Schröder B, Göbel W, Huber K, et al: No effect of vitamin D3 treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48:353-363, 2001
74. Wadhwa DR, Care AD: The absorption of calcium ions from the ovine reticulo-rumen. *J Comp Physiol [B]* 170:581-588, 2000
75. Schröder B, Vossing S, Breves G: In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen. *J Comp Physiol [B]* 169:487-494, 1999
76. Uppal SK, Wolf K, Martens H: The effect of short chain fatty acids on calcium flux rates across isolated rumen epithelium of hay-fed and concentrate-fed sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87:12-20, 2003
77. Breves G, Gäbel G, Pfeffer E, et al: Unidirectional calcium fluxes across the isolated rumen mucosa of goats as affected by 1,25(OH)2D3. *Proc Nutrition Soc* 48:163A, 1989
78. Kemp A, Van't Klooster AT, Rogers PAM, et al: Studies on the amount and composition of digesta flowing through the duodenum of dairy cows. 2. Sites of net absorption of magnesium and calcium from the alimentary tract. *Neth J agric Sci* 21:44-55, 1973
79. van't Klooster AT: Adaptation of calcium absorption from the small intestine of dairy cows to changes in the dietary calcium intake and at the onset of lactation. *Z Tierphysiol Tierernähr Futtermittelkd* 37:169-182, 1976
80. Goetsch AL, Owens FN: Effects of calcium source and level of digestion and calcium levels in the digestive tract of cattle fed high-concentrate diets. *J Anim Sci* 57:503-510, 1985
81. Zinn RA, Shen Y: Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers. *J Anim Sci* 74:2303-2309, 1996
82. Khorasani GR, Armstrong DG: Calcium, phosphorus, and magnesium absorption and secretion in the bovine digestive tract as influenced by dietary concentrations of these elements. *Livestock Prod Sci* 31:271-286, 1992
83. Rahnama S, Wu Z, Ohajuruka OA, et al: Site of mineral absorption in lactating cows fed high-fat diets. *J Anim Sci* 72:229-235, 1994
84. Khorasani GR, Janzen RA, McGill WB, et al: Site and extent of mineral absorption in lactating cows fed whole-crop cereal grain silage of alfalfa silage. *J Anim Sci* 75:239-248, 1997
85. Jeschke C, Flachowsky G, Lebzien P, et al: Calcium net absorption from different segments of the gastrointestinal tract differs with respect to daily calcium intake in dairy cows. *Proc Soc Nutr Physiol* 11:101, 2002
86. Schröder B, Breves G: Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows. *Anim Health Res Rev* 7:31-41, 2006
87. Ricken G: Transport von Calcium über das isolierte Pansenepithel des Rindes. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 2005
88. Zapf J, Donath MY, Schmid C: Untersuchungen zum Wirkungsspektrum der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (insulin-like growth factors, IGF)1. *Schweiz Med Wochenschrift* 130:190-195, 2000

89. Nesbitt T, Drezner MK: Insulin-like growth factor-I regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase activity. *Endocrinology* 132:133-138, 1993
90. Bindels RJ: Calcium handling by the mammalian kidney. *J Exp Biol* 184:89-104, 1993
91. Friedman PA, Gesek FA: Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 75:429-471, 1995
92. Poujeol P, Bidet M, Tauc M: Calcium transport in rabbit distal cells. *Kidney Int* 48:1102-1110, 1995
93. Tan S, Lau K: Patch-clamp evidence for calcium channels in apical membranes of rabbit kidney connecting tubules. *J Clin Invest* 92:2731-2736, 1993
94. Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, et al: Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* 112:1906-1914, 2003
95. Renkema KY, Nijenhuis T, van der Erden BC, et al: Hypervitaminosis D mediates compensatory Ca²⁺ hyperabsorption in TRPV5 knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 16:3188-3195, 2005
96. Bindels RJ, Hartog A, Timmermans JA, et al: Immunocytochemical localization of calbindin-D28k, calbindin-D9k and parvalbumin in rat kidney. *Contrib Nephrol* 91:7-13, 1991
97. van Baal J, Yu A, Hartog A, et al: Localization and regulation by vitamin D of calcium transport proteins in rabbit cortical collecting system. *Am J Physiol* 271:F985-993, 1996
98. Bindels RJ, Ramakers PL, Dempster JA, et al: Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in transcellular Ca²⁺ transport across primary cultures of rabbit kidney collecting system. *Pflugers Arch* 420:566-572, 1992
99. Barsony J, Renyi I, McKoy W: Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. *J Biol Chem* 272:5774-5782, 1997
100. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol* 277:F157-175, 1999
101. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis. *Acta Vet Scand Suppl* 97:35-50, 2003
102. Brumbaugh PF, Haussler MR: Specific binding of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *J Biol Chem* 250:1588-1594, 1975
103. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW: Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 16:200-257, 1995
104. Pike JW, Haussler MR: Purification of chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5485-5489, 1979
105. Haussler MR, Norman AW: Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62:155-162, 1969
106. Allegretto EA, Pike JW, Haussler MR: Immunochemical detection of unique proteolytic fragments of the chick 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. Distinct 20-kDa DNA-binding and 45-kDa hormone-binding species. *J Biol Chem* 262:1312-1319, 1987
107. Nelson D, Cox M: Lipide. *Lehninger Biochemie*, Nelson D, Cox M (Hrsg), Springer Verlag, Berlin, 2001

108. Reichrath J, Classen UG, Meineke V, et al: Immunoreactivity of six monoclonal antibodies directed against 1,25-dihydroxyvitamin-D3 receptors in human skin. *Histochem J* 32:625-629, 2000
109. Haussler MR, Jurutka PW, Hsieh JC, et al: New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* 17:33S-38S, 1995
110. Rougui Z, Bouizar Z, Walrant O, et al: Distinct, tissue-specific regulation of vitamin D receptor in the intestine, kidney, and skin by dietary calcium and vitamin D. *Endocrinology* 139:1844-1852, 1998
111. Wassermann RH, Taylor AN: Vitamin D3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 152:791-793, 1966
112. Kallfelz FA, Taylor AN, Wasserman RH: Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 125:54-58, 1967
113. van Eldik LJ, Zendegui JG, Marshak DR, et al: Calcium-binding proteins and the molecular basis of calcium action. *Int Rev Cytol* 77:1-61, 1982
114. Fullmer CS, Wasserman RH: The amino acid sequence of bovine intestinal calcium-binding protein. *J Biol Chem* 256:5669-5674, 1981
115. Christakos S, Gabrielides C, Rhoten WB: Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev* 10:3-26, 1989
116. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Conformational changes in calmodulin on calcium binding. *Biochemistry*, Stryer L, 4th Edition, WH Freeman and Company, New York, 2001
117. Hunziker W, Schrickel S: Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Mol Endocrinol* 2:465-473, 1988
118. Parmentier M, Ghysens M, Rypens F, et al: Calbindin in vertebrate classes: immunohistochemical localization and western blot analysis. *Gen Comp Endocrinol* 65:399-407, 1987
119. Sonnenberg J, Pansini AR, Christakos S: Vitamin D-dependent rat renal calcium-binding protein: development of a radioimmunoassay, tissue distribution, and immunologic identification. *Endocrinology* 115:640-648, 1984
120. Yamagishi N, Yukawa YA, Ishiguro N, et al: Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49:461-465, 2002
121. Christakos S, Dhawan P, Liu Y, et al: New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88:695-705, 2003
122. Binder HJ, Reuben A: Nutrient digestion and absorption. *Medical Physiology*, Boron W E, Boulpaep EL (Hrsg), Saunders Verlag, Philadelphia, 2003
123. Dupret JM, Brun P, Perret C, et al: Transcriptional and post-transcriptional regulation of vitamin D-dependent calcium-binding protein gene expression in rat duodenum by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *J Biol Chem* 262:16553-16557., 1987
124. Varghese S, Deaven LL, Huang YC, et al: Transcriptional regulation and chromosomal assignment of the mammalian calbindin-D28k gene. *Mol Endocrinol* 3:495-502, 1989

125. Christakos S, Rajbir G, Sooja L, et al: Molecular aspects of the calbindins. *J Nutr* 122:678-682, 1992
126. Airaksinen MS, Eilers J, Garaschuk O, et al: Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1488-1493, 1997
127. Zheng W, Xie Y, Li G, et al: Critical role of calbindin-D28k in calcium homeostasis revealed by mice lacking both vitamin D receptor and calbindin-D28k. *J Biol Chem* 279:52406-52413, 2004
128. Kutuzova GD, Akhter S, Christakos S, et al: Calbindin D9k knockout mice are indistinguishable from wild-type mice in phenotype and serum calcium level. *Biochemistry PNAS* 103:12377-12381, 2006
129. Li YC, Bolt MJ, Cao LP, et al: Effects of vitamin D receptor inactivation on the expression of calbindins and calcium metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E558-564, 2001
130. Bolt MJ, Cao LP, Kong J, et al: Vitamin D receptor is required for dietary calcium-induced repression of calbindin-D9k expression in mice. *J Nutr Biochem* 16:286-290, 2005
131. Akhter S, Kutuzova GD, Christakos S, et al: Calbindin D9k is not required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated Ca²⁺ absorption in small intestine. *Arch Biochem Biophys* 460:227-232, 2007
132. Rhoten WB, Gona O, Christakos S: Calcium-binding protein (28,000 Mr calbindin-D28k) in kidneys of the bullfrog *Rana catesbeiana* during metamorphosis. *Anat Rec* 216:127-132, 1985
133. Friedmann PA, Gesek FA: Calcium transport in renal epithelial cells. *Am J Physiol* 264:FM-F198, 1993
134. Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, et al: Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 74:507-513, 1984
135. Sooy K, Kohut J, Christakos S: The role of calbindin and 1,25dihydroxyvitamin D3 in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:341-347, 2000
136. Li H, Christakos S: Differential regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of calbindin-D9k and calbindin-D28k gene expression in mouse kidney. *Endocrinology* 128:2844-2852, 1991
137. Horst RL: Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. *J Dairy Sci* 69:604-616, 1986
138. Goff JP, Horst RL: Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 80:1260-1268, 1997
139. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Calcium and vitamin D metabolism during lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:253-263, 1997
140. Rittmann I: In-vitro-Untersuchungen zum gastrointestinalen Calcium-Transport bei kleinen Wiederkäuern. Dissertation, Institut für Veterinär-Physiologie, Justus Liebig Universität, Giessen, 1996
141. Schröder B, Pfeffer E, Failing K, et al: Binding Properties of goat intestinal vitamin d receptors as affected by dietary calcium and phosphorus depletion. *Zentralblatt für Veterinärmedizin A* 42:411-417, 1995

142. Wilkens MR: Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum transepithelialen Calcium-Transport beim Schaf. Dissertation, Physiologisches Institut, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 2006
143. Vennekens R, Hoenderop JG, Prenen J, et al: Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem* 275:3963-3969, 2000
144. Yamagishi N, Miyazaki M, Naito Y: The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum. *Vet J* 171:363-366, 2006
145. Hove K, Horst RL, Littledike ET: Effects of 1 alpha-hydroxyvitamin D3, 1,25-dihydroxyvitamin D3, 1,24,25-trihydroxyvitamin D3, and 1,25,26-trihydroxyvitamin D3 on mineral metabolism and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in dairy cows. *J Dairy Sci* 66:59-66, 1983
146. Yamagishi N, Ayukawa Y, Lee I, et al: Calcium metabolism in cows receiving an intramuscular injection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 combined with prostaglandin F(2alpha) closely before parturition. *J Vet Sci* 6:165-167, 2005
147. Schröder B, Breves G, Pfeffer E: Binding properties of duodenal 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors as affected by phosphorus depletion in lactating goats. *Comp Biochem Physiol A* 96:495-498, 1990
148. Riner K: Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schaf und Ziege. Dissertation, Institut für Tierernährung und Veterinär-Anatomisches Institut, Vetsuisse Fakultät, Zürich, 2006
149. Singer K: Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse. Dissertation, Institut für Tierernährung, Vetsuisse Fakultät, Zürich, 2006
150. Liesegang A, Singer K, Boos A: Vitamin D receptor amounts across different segments of the gastrointestinal tract in Brown Swiss and Holstein Frisian cows of different age. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92:316-323, 2008
151. Storry JE: Studies on calcium and magnesium in the alimentary tract of sheep. I The distribution of calcium and magnesium in the contents taken from various parts of the alimentary tract. *J Agric Sci* 57:97-102, 1961
152. Coons AH, Creech HJ, Jones RN: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc exp Biol Med* 47:200-202, 1941
153. Herbst H, Hübner JH: Methoden und Untersuchungstechniken in der Pathologie, Immunhistologie, Pathologie-Online, <http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php>. 2003

3 Manuskript

Influence of different calcium supplies and vitamin D on bone metabolism, vitamin D receptor- and calbindin D9k-immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids.

K. Lauff¹, A. Boos², J. Risteli³, M. Kraenzlin⁴, A. Liesegang¹

1 Institute of Animal Nutrition, University of Zurich, Winterthurerstr. 260, 8057 Zurich, Switzerland

2 Institute of Veterinary Anatomy, University of Zurich, Winterthurerstr. 260, 8057 Zurich, Switzerland

3 Department of Clinical Chemistry, University of Oulu, 90220 Oulu, Finland

4 Endocrine Unit, University Hospital, 4031 Basel, Switzerland

Abstract

The purpose of this study was to investigate, if different calcium (Ca) concentrations in diets have an influence on bone metabolism, vitamin D receptor- (VDR) and calbindin D9k- (Calb9k) immunoreactivities in the gastrointestinal tract of growing goats. Twelve 6 (\pm 1) year old dairy goats (Saanen breed) were randomly divided into two feeding groups. The two groups of goats received 12.5 g Ca/day (Ca ng, Ca normal goat) and 8.5 g Ca/day (Ca lg, Ca low goat), respectively, during late gestation and 16 g Ca/day (Ca ng) and 12.5 g Ca/day (Ca lg) during lactation. The offspring of the adult goats was included in the same group as their mothers. The Ca normal group of goat kids (Ca nk) received 2.5-6 g Ca/day whereas the Ca low group of goat kids (Ca lk) received 1.5-4 g Ca/day from the 6th week (w) (time of weaning) until 15th w (time of sacrifice) of age. In addition, 5, respectively, 6 goat kids of each group (Ca nk, Ca lk) were injected with vitamin D (Cholecalciferol, 0.05 mg/kg BW i.m.) in the 14th w of life. Blood samples were taken from the adult goats 4 w ante partum (ap), at birth, 2, 4 and 6 w post partum (pp). Blood samples from the goat kids were taken at birth, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 15 w pp. Calcium, vitamin D (25OH vitamin D, 25VitD and 1,25(OH)₂ vitamin D, 1,25VitD) concentrations were determined in serum. Bone resorption was quantified by crosslinked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) and bone formation by osteocalcin (OC) in serum. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured using quantitative peripheral computed tomography (pQCT). In all animals these measurements were done in the middle of the diaphysis in the left metatarsus and additionally in the epiphysis of the goat kids. Immediately after slaughter, duodenum (DD) and rumen (RU) were mounted in conventional Ussing chambers. Electrical parameters like resistance and short circuit current were continuously recorded. Unidirectional flux rates of Ca across gastrointestinal tissues were measured. Additionally, tissue specimens

of the gastrointestinal tract were collected from the goat kids aged 15th w. Formaldehyde-fixed paraffin sections were used for VDR and Calb9k immunohistochemistry.

Bone resorption marker concentrations (ICTP) were significantly different between the two feeding groups in goats. ICTP concentrations were higher in the Ca lg compared to the Ca ng groups. In goats, ICTP concentrations increased rapidly before birth and decreased after birth. In contrast to ICTP, OC concentrations decreased in goats before birth and increased rapidly after birth. BMD was higher in goats receiving Ca contents according to requirement at week 6 of lactation.

ICTP was also significantly different between feeding groups in goat kids. ICTP concentrations were higher in the Ca lk compared to the Ca nk groups. In goat kids, ICTP concentrations increased from birth to 2nd w of life and decreased thereafter. In goat kids OC concentrations showed a similar course as ICTP i.e. the values increased from birth to 2nd w (Ca nk) and 4th w pp (Ca lk), respectively, and decreased thereafter. The total BMD was significantly higher in the Ca nk group during the whole experiment. Vitamin D injection showed no effect on bone parameters evaluated in this study. In all kid groups, a netto absorption in rumen and a netto secretion in duodenum were observed. The highest duodenal netto fluxes were measured in animals receiving a vitamin D injection, without significant differences between the feeding groups. VDR immunoreactions were highest in duodenal mucosa and lower in the distal intestinal segments. Calb9k immunoreactions were observed in forestomach and intestines. Strongest immunoreactions were measured in superficial epithelium. The highest expression was seen in the duodenal surface epithelium. In jejunum and ileum the expression were lower. Additionally, in the kid groups with vitamin D injection a significant immunoreaction occurred in the jejunal superficial gland, jejunal basal gland and the ileal superficial epithelium. In contrast, the kids without injection showed no Calb9k immunoreactions at these sites.

In conclusion, these data showed that low Ca supply in small ruminants leads to higher bone resorption rates in the mothers during late gestation and early lactation. There is clear evidence for the rumen as a main site for Ca absorption in growing goat kids. The results of this study also indicate that VDR and Calb9k are highly expressed in the duodenal mucosa. The active absorption may not play such an important role in the duodenum as there was also active transport evident in the rumen. But Calb9k expression seems to be stimulated by the active form of vitamin D in goat kids.

Introduction

The goal of an optimal mineral supply is to achieve a well-balanced steady-state between requirement and intake. Mobilization of Ca from bone and increased absorption from the gastrointestinal tract are required to reestablish homeostasis during times of low Ca supply or high Ca needs. In addition, during different stages of reproduction and growth, requirements of Ca vary and have to be met to maintain the physiological processes¹. In female mammals, late gestation and lactation are periods of high Ca requirements in which Ca homeostasis is exposed to significant changes that may alter bone mass². Maternal mineral and bone metabolisms are stressed due to skeletal mineralization of the fetus during late pregnancy and milk production during lactation^{3,4}. In goats, Ca requirements increase from 10.5 g Ca/d during late gestation up to 30 g Ca/d during lactation⁵. In goat kids, Ca requirements decrease from 5 g Ca/d in the first two months to 4.5 g Ca/d from the third month of life⁵. In growing animals, Ca is essential for normal growth and maintenance of bones and teeth to prevent metabolic bone diseases. The Ca balance is controlled by three organ systems, including the gastrointestinal tract, bone and kidney⁶. Calcium concentration is maintained at normocalcemic levels by calcitonin, parathyroid hormone (PTH) and 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25VitD), the active form of vitamin D⁷. Synthesis of 1,25VitD requires the renal cytochrome P450 enzyme 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase (1 α -OHase). PTH stimulates 1,25VitD production by 1 α -OHase activation and the release of Ca from bone to maintain plasma Ca levels, whereas calcitonin lowers plasma Ca concentrations by inhibition of bone resorption⁸. During gestation and lactation, Ca homeostasis may also involve other hormones such as PTH-related peptide (PTHrP), estrogens, and prolactin⁹. In monogastric animals, intestinal Ca absorption is assumed to be achieved by two mechanisms: an active, transcellular transport and a passive paracellular pathway^{10,11}. The feedstuff influence the Ca content in chyme, i.e. with adequate or high Ca intake, Ca contents in chyme are high. Passive paracellular pathways are thought to be predominant under that circumstance and the involved hormones and proteins are down-regulated^{12,13}. When Ca intake is low, active, vitamin D-dependent transcellular pathways play a major role in Ca absorption^{11,14} by altering the endocrine vitamin D system¹⁵. Active Ca transport is mainly regulated by 1,25VitD, via transcriptional activation of genes by binding of 1,25VitD to its classical nuclear receptor¹⁶. This initiates a cascade of macromolecular interactions ultimately leading to transcription of selected target genes in bones, e. g. osteocalcin and osteopontin¹⁷ and also in other organs. The produced proteins are increasing the entry of Ca into blood from bone stores and dietary

sources. The transcellular Ca absorption in the intestine is divided into three steps: First, passive entry of ionised Ca into enterocytes via transient receptor potential vanilloid channel type 6 (TRPV6)^{18,19}; second, cytosolic transfer of Ca bound to Calb9k, a vitamin D-dependent calcium binding protein²⁰⁻²² and third, the extrusion of Ca across the basolateral membrane, where Ca pumps, predominantly plasma membrane Ca ATPase (PMCA1b) and sodium Ca exchanger (NCX), transport Ca into the blood^{23,24}. Similar transport mechanisms also exist in the kidney and placenta²⁵. TRPV6, Calb9k, PMCA1b and NCX are considered to be essential for transcellular Ca absorption. They are known to be enhanced by 1,25VitD in mouse and chick intestine^{15,26-28}. In contrast Akhter et al.²⁹ and Benn et al.³⁰ recent data obtained in Calb9k null mutant mice indicated that Calb9k is not required for 1,25VitD-mediated Ca absorption in the small intestine. Maybe there is an interaction of TRPV6 with other proteins which modulate the function for the Ca entry. Calbindin may be compensated for by another factor and may also have another role in the intestine, for example as a modulator of calcium channel activity and/or as an intracellular calcium buffer³⁰. The sensitivity of the genes related to the intestinal Ca absorption via VDR remains unclear. However, due to the 1,25VitD mediated rapid responses on Ca increase through epithelial cells or other responses, the question arises if there is a possibility of a second VDR located in the plasma membrane of epithelial cells, but that is an other challenge to identify and fully biochemically characterize the membrane associated VDR³¹.

The principle of the monogastric intestinal Ca transport may not be strictly applicable to ruminants. In vivo and in vitro studies indicated marked differences in vitamin D dependent Ca transport mechanisms between monogastric and ruminant species along the gastrointestinal tract^{32,33}. Furthermore the mobilisation of Ca from bone may not be identical even between ruminant species. Liesegang et al.³⁴⁻³⁶ showed that dairy goats and dairy cows have different Ca and bone metabolism characteristics compared to milk sheep. Growing goats had a higher bone turnover than growing sheep³⁷. Generally the organism can adapt to different stages of reproduction and growth but the mechanism of the adaptation to changing Ca needs are up to now not completely understood. Growth, gestation and lactation stimulate intestinal Ca absorption, whereas aging is accompanied by a decrease in the absorption rate of Ca as in dairy cattle, pigs and rats where intestinal VDR concentrations decrease with age³⁸⁻⁴⁰. The intestinal expression of Calb9k is vitamin D dependent⁴¹ and there are regional differences in intestinal expression, with highest levels in duodenum in humans⁴². The goal of the present study was, to measure if normal and low Ca intake with or without administration of 1,25VitD alter active Ca absorption in duodenum and rumen. Additionally, in growing goat

kids the influence of the diet according to Ca requirements or low in Ca on bone metabolism, VDR- and Calb9k-immunoreactivities was investigated.

Material and methods

Animals

The trial included twelve 6 ± 1 (mean \pm SD) year old dairy goats (Saanen breed) and their offspring. Animals were housed in individual pens bedded with sawdust. The animals were randomly divided into two groups with six animals each. 6 mothers received a low Ca diet (Ca lg, Ca low goats) during late gestation (4 w ap; 8.5 g Ca/d) and lactation (6 w pp; 12.5 g Ca/d). Six mothers (Ca ng, Ca normal goats) were fed according to Ca requirements (10.5 g Ca/d in gestation; 16 g Ca/d in lactation)⁵. The offspring of the goats were included in the same groups as their mothers. After weaning (6 w pp) goat kids were fed individually about 9 w. The Ca low kid group (Ca lk) received 1.5-4 g Ca per day and the Ca normal kid group (Ca nk) received 2.5-6 g Ca/d from the 6th to 15th week of life, respectively (Fig. 1). All animals received a diet which was balanced in energy and protein. The diet consisted of hay and concentrate (Tables 1 and 2). Additionally, they had free access to water and a mineral stone (Agrosal, Heilbronn, Germany; without Ca). Seven days prior to sacrifice (14th week post partum) 5, respectively, 6 goat kids of each group (Ca lk and Ca nk) received a 1,25VitD injection (0,05 mg/kg BW i.m., Cholecalciferol, vitamin D₃ “S” ad u. vet., Streuli, Switzerland). The groups of goat kids were then addressed as Ca lkVitD and Ca nkVitD.

Table 1 Chemical analysis and composition of diets (in g/kg dry matter)

chemical analysis (g/kg DM)	Hay	Concentrate ^{b1} Ca normal	Concentrate ^{b2} Ca low
crude protein	77.81	122.96	128.68
crude fibre	294.28	57.02	56.62
crude ash	58.88	58.65	46.39
crude fat	13.17	45.83	47.10
Calcium	4.04	11.81	6.20
Phosphor	2.22	3.99	4.17
Magnesium	1.59	1.90	2.04

DM=dry matter; b=KLIBA 2705^{b1}, 2704^{b2}, 7 MJ NEL/kg (main source: corn and barley); during late pregnancy and early lactation (n=6 for each group; ng=normal calcium concentration goat; lg=low calcium concentration goat; during 9 week-feeding trial (n=11 for each group; nk=normal calcium concentration goat kid; lk=low calcium concentration goat kid); pp=weeks post partum

Table 2 Amount fed to the adult goats

Ingredient (kg of DM)	Ca ng pregnancy	Ca lg pregnancy	Ca ng lactation	Ca lg lactation	Ca nk+lk 6pp-8pp	Ca nk+lk 9pp-15pp
Hay	1.3	1.2	2.4	2.3	0.36	0.45
Concentrate ^b	0.5 ^{b1}	0.5 ^{b2}	0.5 ^{b1}	0.5 ^{b2}	0.35 ^{b1,2}	0.35 ^{b1,2}
Total amount DM fed	1.8	1.7	2.9	2.8	0.71	0.8

DM=dry matter; ^bKLIBA 2705^{b1}, 2704^{b2}, 7 MJ NEL/kg (main source: corn and barley); during late pregnancy and early lactation (n=6 for each group; ng=normal calcium concentration goat; lg=low calcium concentration goat; during 9 week-feeding trial (n=11 for each group; nk=normal concentration goat kid; lk=low calcium concentration goat kid); pp=weeks post partum

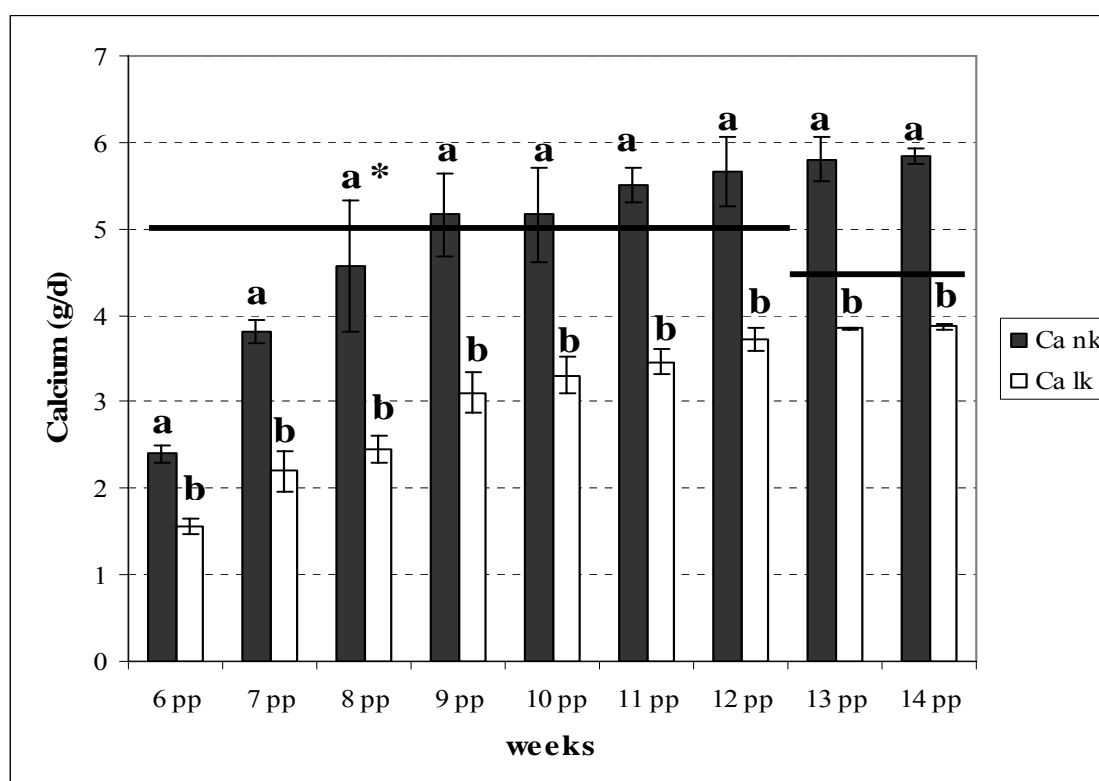


Fig. 1 Calcium intake of goat kids (mean \pm SE) in g/d during the 9 week-feeding trial (n=11 for each group; Ca nk=normal calcium concentration goat kid; Ca lk=low calcium concentration goat kid) pp=post partum; Different letters indicates significant differences between Ca nk and Ca lk ($p \leq 0.05$); * Indicates significant differences between the time point before to time point after; black bar indicates daily Ca-need

Collection of blood samples

Blood samples were collected from the external jugular vein (Vacutainer[®]; 9 or 6 ml, without additives, Vacuette[®] Greiner Bio-One Vacuette, St. Gallen, Switzerland). Blood was centrifuged (1580 x g, 10 min) within 30 minutes of collection. Two tubes of the serum were stored at -20 °C and one tube at -80 °C until analyses were performed.

Analysis of serum Samples

Serum was analyzed for Ca, ICTP, OC and 1,25VitD as previously described^{37,43,44}.

Measurement of 25-hydroxy vitamin D

Serum 25VitD measurements were performed using a kit from Chromsystems Instruments and Chemicals GMBH (Munich, Germany), which allows the chromatographic determination of 25VitD using a simple isocratic high performance liquid chromatographic system employing an ultraviolet detector (HP-1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The intra- and interassay CVs were 4.4% and 5.6%⁴⁵.

Bone mineral density and bone mineral content

After measuring the length of the left metatarsus of the living animals, total BMD and BMC were measured with pQCT (Stratec XCT 2000 bone scanner; Stratec Medizinaltechnik GmbH, Pforzheim, Germany)⁴⁶. The measurements were performed in the middle of the diaphysis (50% of the length of metatarsus). The goat kids were additionally measured at the distal epiphysis (90% of the length of metatarsus). Cortical BMC and BMD were calculated by automated computation (Cortical mode 2; threshold for cortical bone >640 mg/cm³).

Tissue sampling and processing

Within 10 minutes, after slaughter of the goat kids, pieces of rumen and duodenum were collected for the Ussing chamber technique and within 15 min 5-cm-long tubular pieces of duodenum (DD), jejunum (JJ), ileum (IL), caecum (CC) and colon (CO) and pieces of rumen (RU), reticulum (RET), psalter (PSA) and abomasum (ABO) were collected and fixed in neutral buffered 4% formaldehyde solution for 26 hours (h). The piece of the DD was taken directly after pancreatic duct entrance and JJ, IL and CC probes were taken from the central part of these segments. The segment of the colon was taken 40 cm cranial of the anus. The pieces from the RUM, RET and PSA were taken from the base and finally a piece of the ABO was taken in the middle of the greater curvature. If necessary, gastrointestinal samples were washed with physiological saline, if these were soiled with chymus. After fixation all gastrointestinal probes were cut into pieces of 1 cm in length and rinsed in tap water for 24 h. This procedure was followed by dehydration in graded ethanol (70%, 80%, 96% and 100%), xylene and paraffin (60°C) for 2 x 4 h and finally embedding in paraffin (histowax[®], Leica). Transverse sections of 5 µm in thickness were cut, mounted on Superfrost[®] plus adhesive slides (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) and dried at 60°C at night. Sections were stained with hematoxylin and eosin⁴⁷ to verify the physiological state of the tissues and exclude animals possibly exhibiting pathological changes of the intestine.

Ussing chamber technique

Tissue specimens of duodenum and rumen were mounted in a modified Ussing chamber⁴⁸ and bathed with a volume of 3.5 ml buffer solution on both sides of the intestinal wall. The Parson buffer solution contained (in mmol l⁻¹): NaCl 107; KCl 4.5; NaHCO₃ 25; Na₂HPO₄ 1.8; NaH₂PO₄ 0.2; CaCl₂ 1,25; MgSO₄ 1; and glucose 12.2; it was gassed with 5% CO₂ in 95% O₂ and kept at 37°C; pH was adjusted to 7.4. The epithelium was continuously short-circuited by an automatic voltage-clamp device (Aachen Microclamp, AC Copy Datentechnik, Aachen, Germany) with correction for solution resistance. Tissue conductance (G_t) was measured by recording the voltage resulting from bipolar current pulses (± 100 mA) applied across the tissue at 1 min intervals and calculated according to Ohm's law. The values for G_t and the continuously applied short-circuit current (I_{sc}) were recorded every minute. 10 min after mounting the tissues in the chambers, 10 μ l ⁴⁵Ca²⁺ was added to one side of the intestinal wall (labelled side). After additional 60 min to allow isotope fluxes to reach a steady state and I_{sc} to stabilize, unidirectional ion fluxes were determined in sequential 20 min periods. From the measured unidirectional fluxes (J_{ms} , flux from mucosa to serosa; J_{sm} , flux from serosa to mucosa), net ion fluxes (J_{net}) were calculated according to $J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$ (nmol/h/cm²) from the mean unidirectional fluxes.

Immunohistochemistry for vitamin D receptor

The method was described previously³⁶. Briefly, biotinylated rat monoclonal antibody (9A7 γ , Neo-Markers, P. H. Stehelin & Cie AG, Basel, Switzerland) was used to label VDR in gastrointestinal sections. This antibody was used at a 1:200 dilution. Negative controls were performed using TBS instead of primary antibody and positive controls employing duodenal crosssections of pigs (cross-reactivity proven and giving identical results)^{49,50}. The semiquantitative evaluation of histochemical reactions for VDR was performed as described previously, i.e. an immunoreactive (IRS) was calculated for the coloured intensity (CI) using this formula: $IRS = 0 * n(CI0) + 0,25 * n(CI0,25) + 1 * n(CI1) + 4 * n(CI4) + 9 * n(CI9)$ ^{35,36}.

Immunohistochemistry for calbindin D9k

The method was done by an immunohistochemical protocol (Table 3). All subsequent steps were done at room temperature. Negative controls were performed using TBS instead of primary antibody and positive controls employing intestinal cross sections of rabbits.

Table 3 immunohistochemical protocol for Calb9k

work step	time
1. Xylene	3 x 5 min
2. 100% Ethanol	2 x 3 min
3./4. 96% Ethanol and 70% Ethanol	each 2 min
5. TBS ¹	5 min
6. 3% H ₂ O ₂ and Methanol	10 min
7./8. TBS ¹ , slides on coverplates	
8. TBS ¹	3 min
9. incubate with 10% normalgoat protein block ²	20 min
10. incubate with serum-free protein block ³	10 min
11. incubate with primary antibody ³	60 min
12. TBS ¹	2 x 5 min
13. incubate with Poly-HRP anti rabbit IgG ⁵	30 min
14. TBS ¹	2 x 5 min
15. DAB ⁶	3 min
16. TBS ¹	3 min
17./18. 70 % Ethanol and 96% Ethanol	15 sec
19. 100% Ethanol	2 min
20. Xylene	5 min
21. coverslip Pertex [®] (Medite)	

¹tris-buffered solution (tris-buffer and sodium chloride solution); ^{2,3}DakoCytomation, Zug, Switzerland; ⁴rabbit antibody to Calb9k (swant, Bellinzona, Switzerland, dilution of 1:5000); ⁵eubio, Vienna, Austria; ⁶diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen (DakoCytomation)

The microscopic analysis of the slides was done with a light microscope (Leica DMLB, Leica Microsystems AG, Glattbrugg, Switzerland). Following histomorphological examination, the slides were assessed with a computerized digital camera (Colorview 12, Leica Microsystems AG, Glattbrugg, Switzerland) analyzing the mean colour intensity – i.e. grey scale values – of cells or tissues. The software used was analySIS Pro[®] (version 5.0; Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany). This procedure was always performed under standardized conditions, thus eliminating primarily errors normally occurring during visual grading of histochemical colour intensities. This does, however, not eliminate interassay variations, which are caused by the use of slides processed histochemically in several succeeding batches^{51,52}. Digitalized pictures were taken, white balance was done, i.e. measurement in a tissue-free district of the section thus representing 100 % transmission, randomly selected regions of interest were defined containing immunopositive structures such as superficial epithelium (SE), epithelium of superficial glands (SG) and basal glands (BG) and colour intensity was measured. The mean colour intensity – i.e. grey scale value – of a selected structure within a region of interest was measured employing 256 different colour levels, whereas zero represents black and 255 represents white. This means that high grey scale values correspond to low immunoreaction intensities. After assessing five tissue areas within

the tissue, for each immunopositive structure per slide a mean value per structure and animal was calculated. Transmission (T) values were transformed to extinction (E) which is proportional to dye concentrations at the level of the sections ($E = \lg 1/T$). This value was used for further statistical analysis.

Statistical analysis

The results are presented as mean \pm standard error (SE). A multivariate analysis of variance for repeated measures (ANOVA) was performed with group as a cofactor included in the model to test difference of the time dependent patterns between the groups. To avoid false conclusions due to a violation of the assumption of compound symmetry, a Huynh–Feldt correction was performed. The statistical differences between the sampling days within the species were analyzed with a Wilcoxon's sign rank test for paired samples. Furthermore, the difference between groups was tested with the Mann–Whitney U test (non-parametric) to limit the influence of extreme values. The level of significance was set at $\alpha = 0.05$ for all tests. Bivariate correlation was analysed using the Pearson's correlation coefficients (r) to identify associations among ICTP and OC. All statistical analyses were performed by use of SYSTAT® for Windows® (Version 11.0, SPSS Inc. Chicago, IL).

Results

In late gestation, i.e. one week before parturition the goats weighed 91.3 ± 3 kg (mean \pm SE) (Ca ng) and 89.9 ± 4.4 kg (Ca lg), directly after birth the body weight was 74 ± 3.5 kg (Ca ng) and 77.8 ± 3.9 kg (Ca lg). All, but 3 goats, had twins and one triplets, weighing 4.8 ± 0.2 kg on average per kid. At sacrifice the kids weighed 22.6 ± 0.6 kg. The goats of Ca ng secreted 1.88 ± 0.35 g/l Ca and Ca lg 1.37 ± 0.38 g/l Ca in colostrum. At weaning (6th week pp) the Ca concentrations in milk were 1.25 ± 0.05 g/l Ca (Ca lg) and 1.21 ± 0.11 g/l (Ca ng), without significant differences.

In goats, mean Ca concentrations in serum were 2.35 ± 1.05 mmol/l (Ca ng) and 2.30 ± 1.01 mmol/l (Ca lg) (Table 4) over the whole trial (reference value: 2.2-2.7mmol/l⁵³).

Table 4 Mean total Ca concentrations (\pm SE) in serum in goats (mmol/l).

Group ¹	goats				
	4 ap	birth	2 pp	4 pp	6 pp
Ca ng	2.51 \pm 1.45	2.21 \pm 0.90	2.33 \pm 1.35	2.34 \pm 0.95	2.36 \pm 0.96
Ca lg	2.34 \pm 1.05	2.35 \pm 1.05	2.27 \pm 1.01	2.26 \pm 1.01	2.28 \pm 1.02

¹ng=normal calcium concentration goat; lg=low calcium concentrations in goats (n=6 for each group); ap=ante partum; pp=post partum

Mean 25VitD concentrations in serum showed no significant group effect in the goats. All goats had significantly higher concentrations of 25VitD at birth ($p \leq 0.005$) compared to all other time points during lactation (Fig. 2).

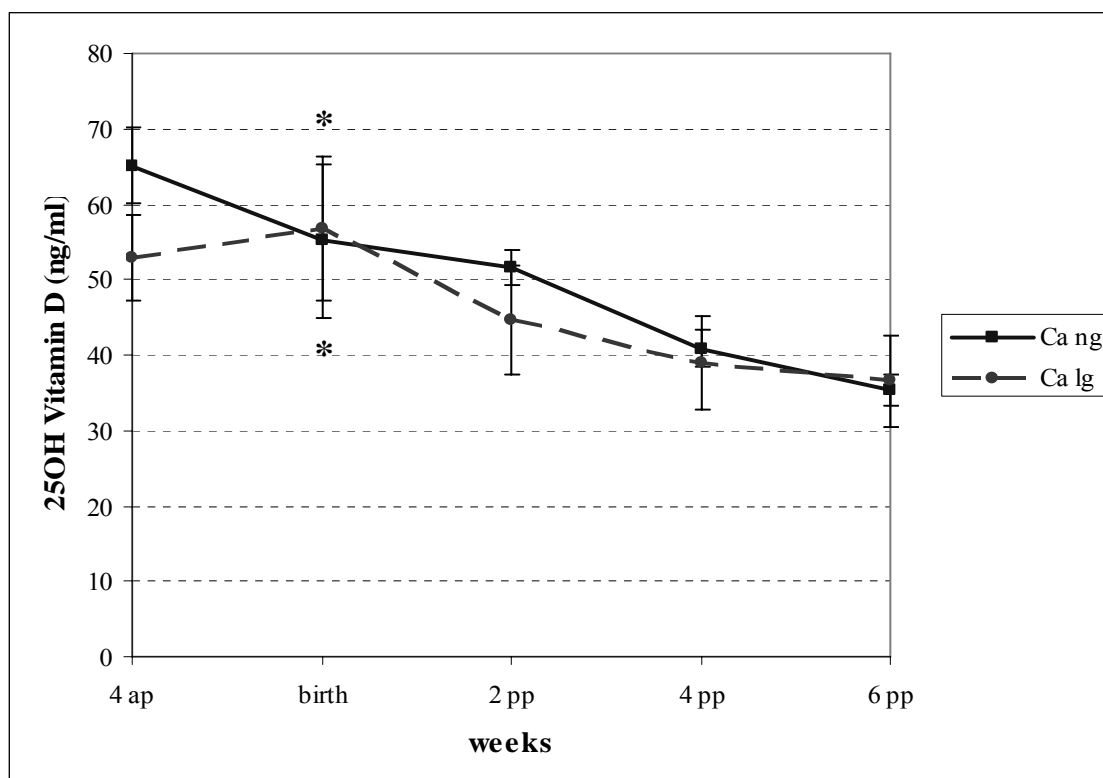


Fig. 2 Mean (\pm SE) 25VitD concentrations in serum in goats. Feeding trial during late pregnancy and early lactation (n=6 for each group; ng=normal calcium concentration goat; lg=low calcium concentration goat). * Indicates significant differences between the time point compared to all later time points within goats ($p \leq 0.05$).

In goats mean 1,25VitD concentrations increased from 4th w ap to birth and decreased from birth to 6th w pp in Ca ng group. In Ca lg group the 1,25VitD concentrations increased from 4th w ap to 2nd w pp, decreased from 2nd w pp to 4th w pp and increased from 4th to 6th w pp. Significant differences existed only within time, i.e. significant differences were recorded in the 4th w ap as compared to all other time points ($p \leq 0.01$) (Fig. 3).

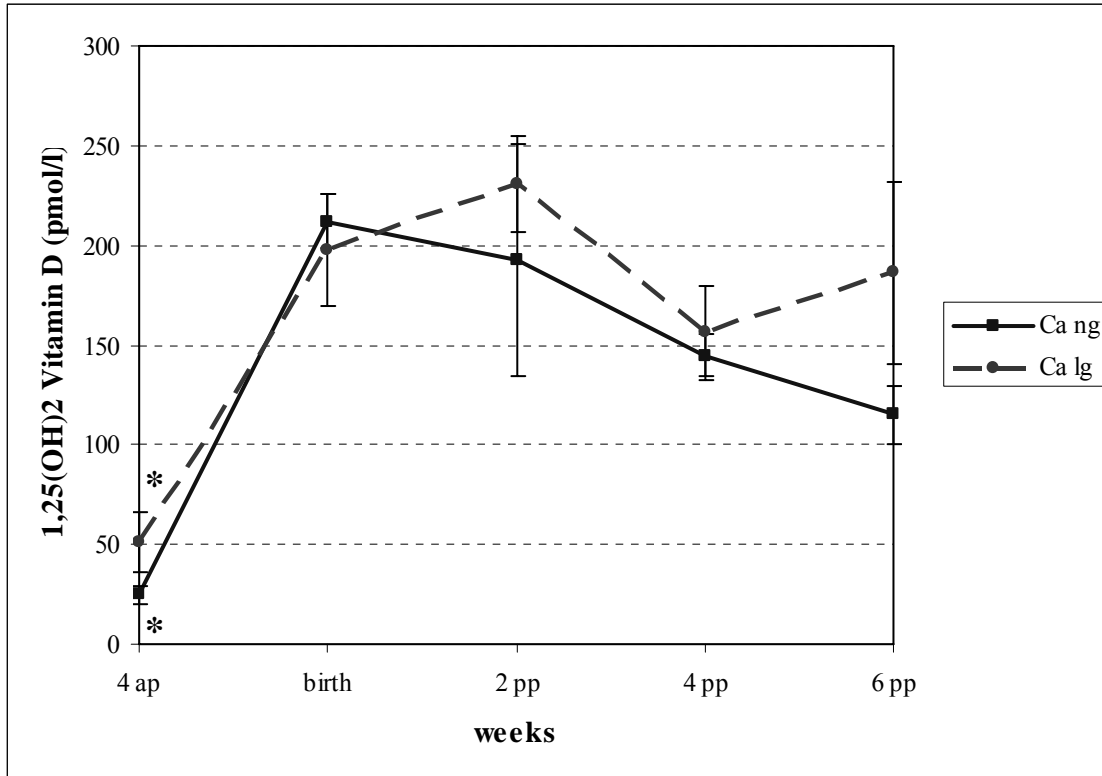


Fig. 3 Mean (\pm SE) 1,25VitD concentrations in serum in goats. * Indicates significant differences between the time points compared to all other time points within goats ($p \leq 0.05$). See Fig. 2 for key.

In the goats mean ICTP concentrations significantly increased before parturition and decreased after parturition ($p \leq 0.05$). ICTP concentrations were significantly different at birth ($p = 0.037$). ICTP concentrations of Ca lg always showed higher values than Ca ng group over the trial and no additionally significant differences (Fig. 4).

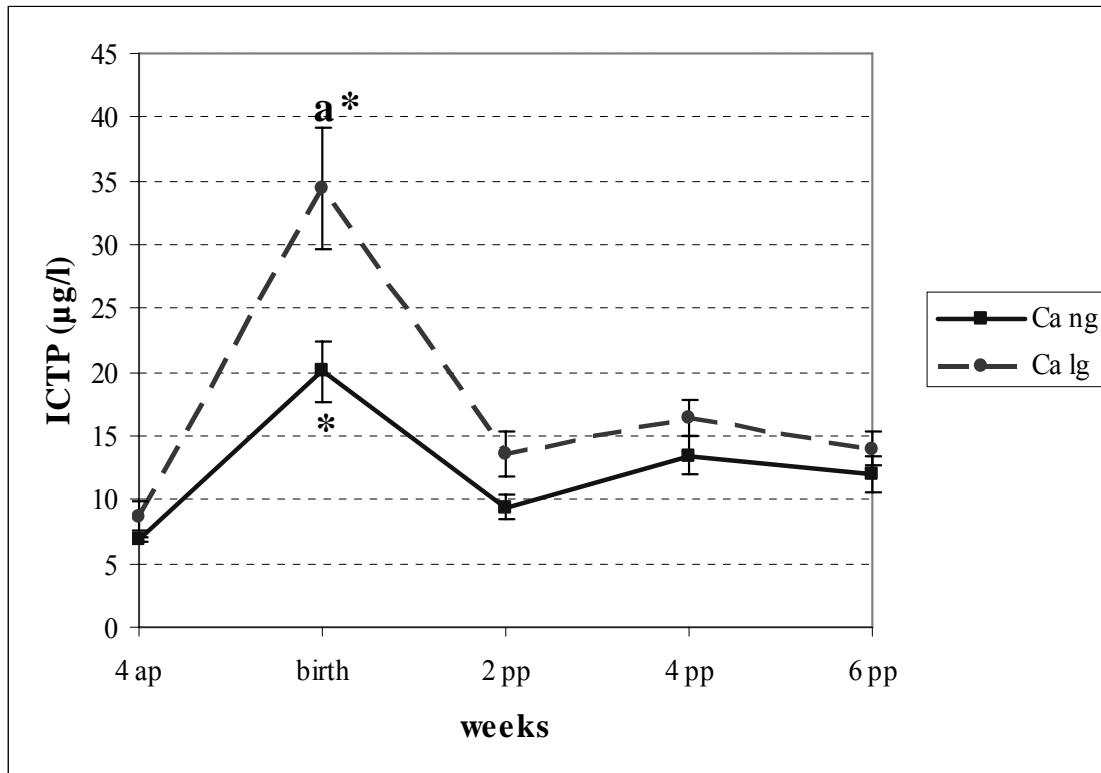


Fig. 4 Mean (\pm SE) crosslinked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) concentrations in serum in goats. Letter “a” indicates significant differences between Ca ng and Ca lg ($p \leq 0.05$). * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goats ($p \leq 0.05$). See Fig. 2 for key.

In goats, mean OC concentrations decreased before birth and increased from birth to 6th w pp ($p \leq 0.01$). Significant differences between groups were observed at birth ($p = 0.025$). In the Ca lg group OC concentrations were higher during the whole experiment (Fig. 5).

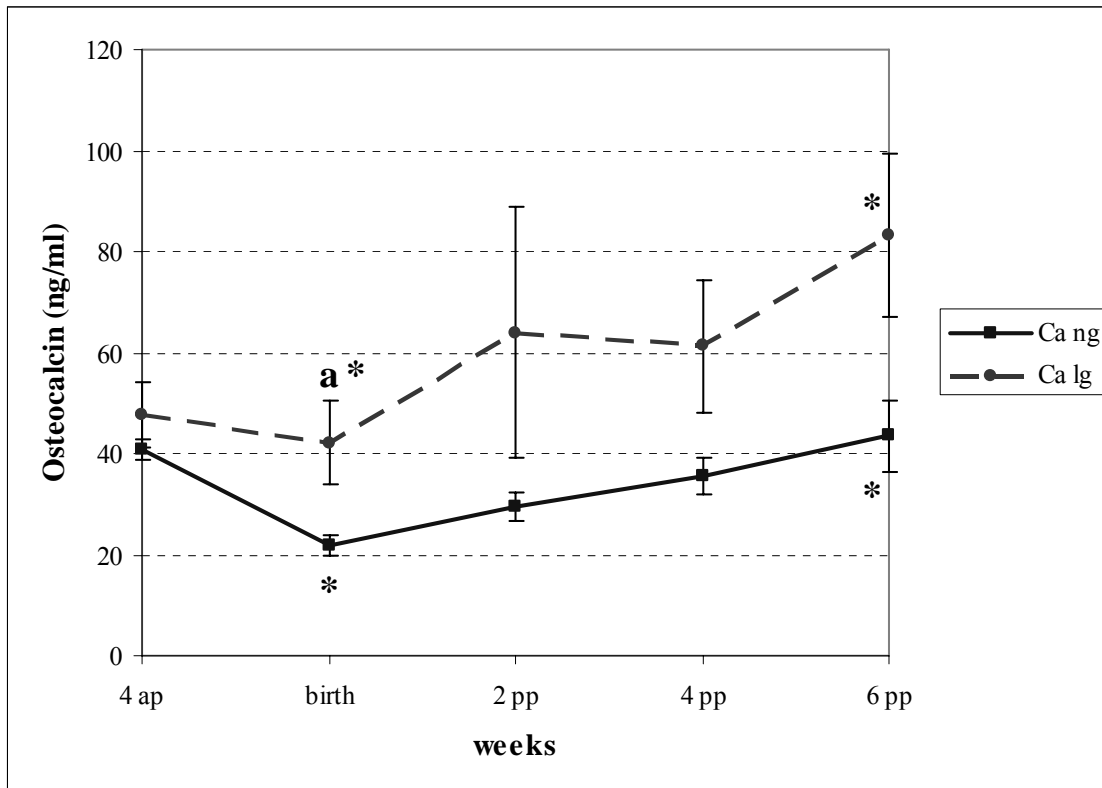


Fig. 5 Mean (\pm SE) osteocalcin (OC) concentrations in serum in goats. Letters indicates significant differences between Ca ng and Ca lg ($p \leq 0.05$). Letter “a” indicates significant differences between Ca ng and Ca lg ($p \leq 0.05$). * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goats ($p \leq 0.05$). See Fig. 2 for key.

In goats total bone mineral density (BMD) decreased from 4th w ap to 6th w pp. In Ca ng group the BMD was higher at 6th w pp but there were no significant differences between the groups. There is a significant difference from 4th w ap to 6th w pp ($p = 0.008$) and from 4th w pp to 6th w pp ($p = 0.05$) in both groups (Fig. 6). The total bone mineral content (BMC) decreased in both groups but showed no significant differences within the groups and the time during the trial ($p > 0.05$).

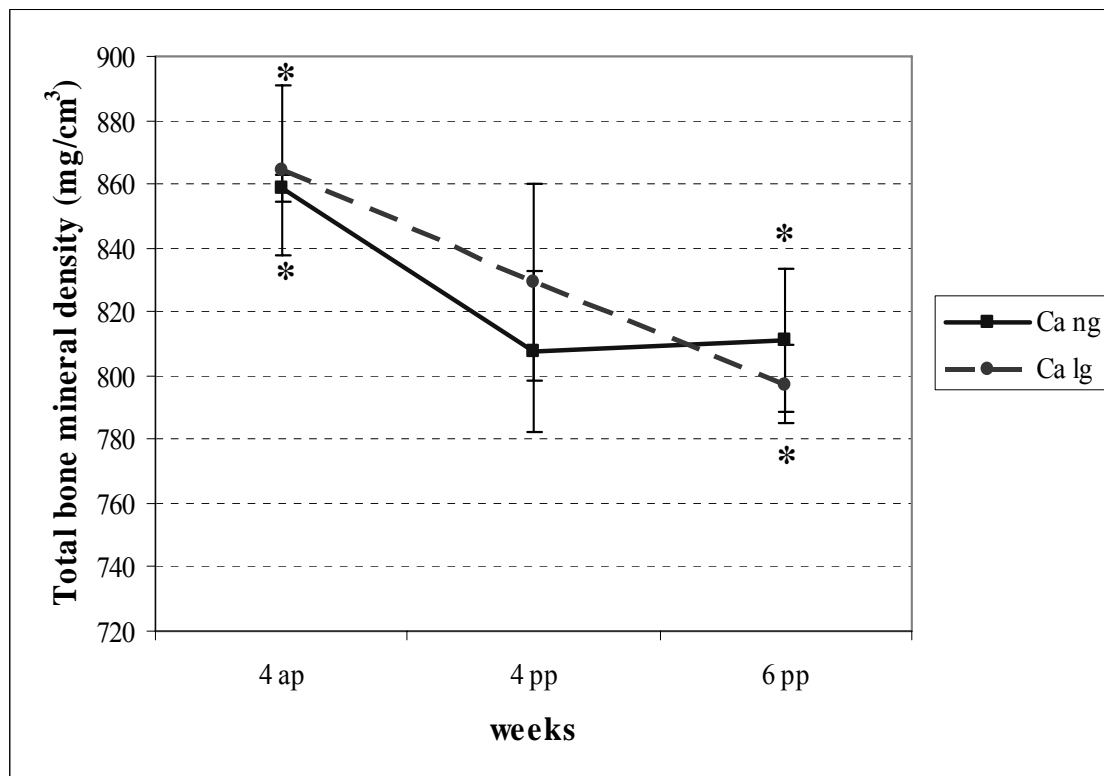


Fig. 6 Total bone mineral density (BMD) (Mean \pm SE) in goats. * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goats ($p \leq 0.05$). See Fig. 2 for key.

Table 5 Mean total Ca concentrations (\pm SE) in serum in goat kids (mmol/l).

Group¹	goat kids								
	birth	2 pp	4 pp	6 pp	8 pp	10 pp	12 pp	14 pp	15 pp
Ca nk	2.85 \pm 1.28	3.21 \pm 1.44	3.25 \pm 1.46	2.92 \pm 1.30	2.86 \pm 1.43	2.70 \pm 1.35	2.67 \pm 1.19	2.71 \pm 1.36	2.65 \pm 1.32
Ca nkVitD	2.83 \pm 1.15	n.m.	3.03 \pm 1.24	2.83 \pm 1.15	2.86 \pm 1.65	2.87 \pm 1.66	2.79 \pm 1.39	2.75 \pm 1.59	2.75 \pm 1.38
Ca lk	2.87 \pm 1.44	3.22 \pm 1.61	3.22 \pm 1.61	2.95 \pm 1.47	2.78 \pm 1.60	2.77 \pm 1.60	2.84 \pm 1.42	2.74 \pm 1.37	2.77 \pm 1.38
Ca lkVitD	2.94 \pm 1.31	3.16 \pm 1.41	2.88 \pm 1.29	2.66 \pm 1.19	2.75 \pm 1.37	2.79 \pm 1,25	2.73 \pm 1.22	2.75 \pm 1.38	2.80 \pm 1,25

¹nk=normal calcium concentration goat kid, n=5; nkVitD=normal calcium concentration and 1,25VitD injection, n=6; lk=low calcium concentration goat kid, n=6; lkVitD=low calcium concentration and 1,25VitD injection, n=5); pp=weeks post partum; n.m.=not measured

In goat kids the Ca concentrations in serum did not differ significantly and were 2.85 ± 0.69 mmol/l (Ca nk) and 2.87 ± 0.68 mmol/l (Ca lk) (Table 5).

The 25VitD concentrations decreased from birth to 6th w pp and increased significantly from 6th w pp until the 14th w pp ($p \leq 0.031$). Mean 25VitD concentrations showed lower values in the Ca lk group compared to the Ca nk group but no significant differences were evaluated for the diets until the 14th w pp. After the 1,25VitD injection (14th w pp) the goat kids had significantly higher concentrations in the 15th w pp than the kids without injection ($p < 0.001$) (Fig. 7).

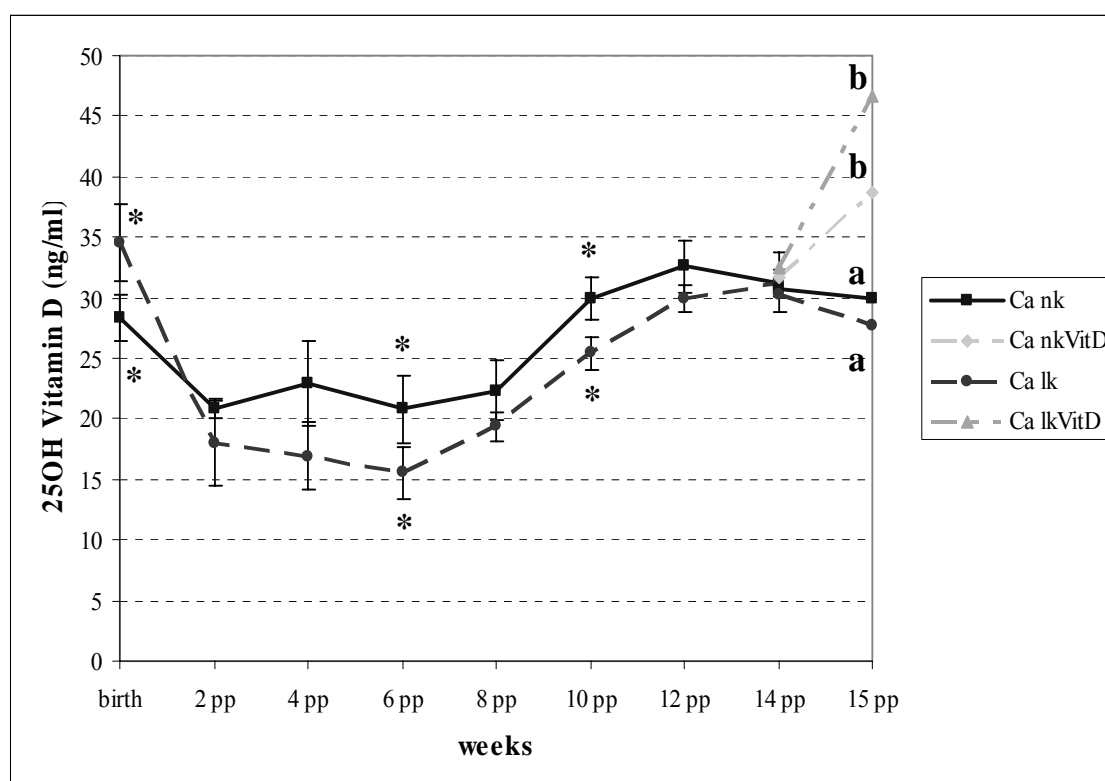


Fig. 7 Mean (\pm SE) 25VitD concentrations in serum of goat kids. nk=normal calcium concentration goat kid, n=5; nkVitD=normal calcium concentration and 1,25VitD injection, n=6; lk=low calcium concentration goat kid, n=6; lkVitD=low calcium concentration and 1,25VitD injection, n=5. Different letter indicates significant differences between groups with and without 1,25VitD injection ($p \leq 0.05$). * Indicates significant differences between the time points before to time point after within goat kids ($p \leq 0.05$).

In goat kids mean 1,25VitD showed the highest values at birth and 2 w pp. After the 2nd w pp, 1,25VitD concentrations decreased to 8th w pp ($p \leq 0.05$) and showed thereafter nearly the same values from 8th w pp to 14th w pp. In the groups receiving a 1,25VitD injection the 1,25VitD concentrations showed no significant differences (Fig. 8).

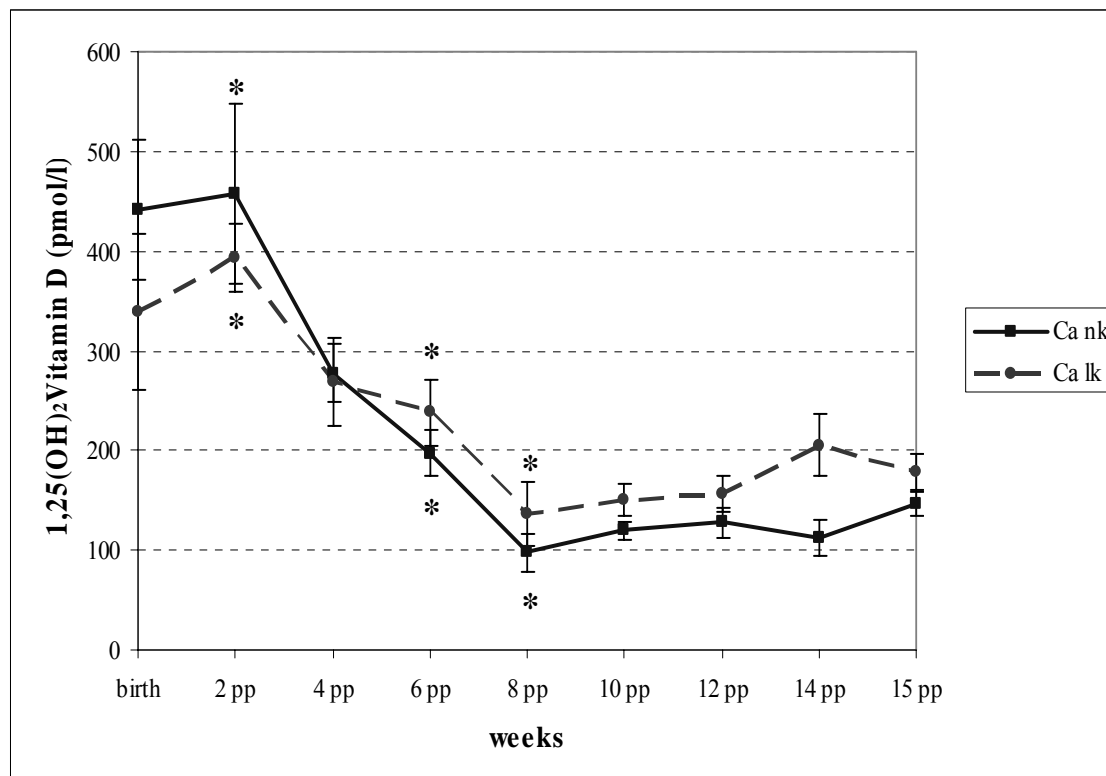


Fig. 8 Mean (\pm SE) 1,25VitD concentrations in serum in goat kids. * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goat kids ($p \leq 0.05$). See Fig. 2 for key.

In the goat kids ICTP concentrations significantly increased from birth to 2nd w pp ($p = 0.0001$) and decreased thereafter with time in all kid groups ($p \leq 0.005$) (Fig. 9). ICTP concentrations were significantly different at birth ($p < 0.0001$) within kid groups. The Ca lk had higher values until the 8th w pp compared to the Ca nk group, but no significant differences were evident following the 1,25VitD injection.

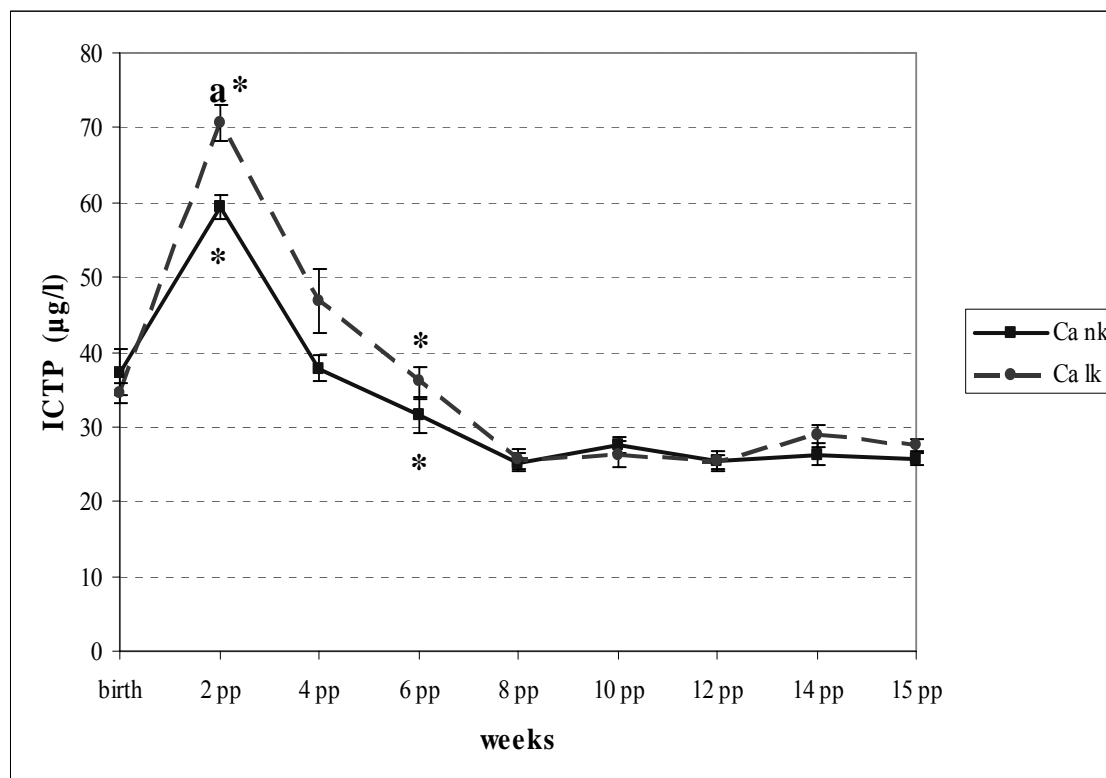


Fig. 9 Mean (\pm SE) crosslinked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) concentrations in serum during a 9-week lasting feeding trial in goat kids ($n=11$ for each group; Ca nk=normal calcium concentration goat kid; Ca lk=low calcium concentration goat kid) Letter “a” indicates significant differences between Ca nk and Ca lk ($p \leq 0.05$). * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goat kids ($p \leq 0.05$).

In the kids, OC concentrations showed a similar pattern as ICTP. At the beginning, mean OC concentrations in kids increased from birth to 2nd w in Ca nk, to 3rd w pp in Ca lk group, respectively, and decreased to values at birth until the 15th w pp. However, OC concentrations changed significantly with time ($p \leq 0.05$) in the kids, but no significant influence of the diet or 1,25VitD injection were recorded (Fig. 10).

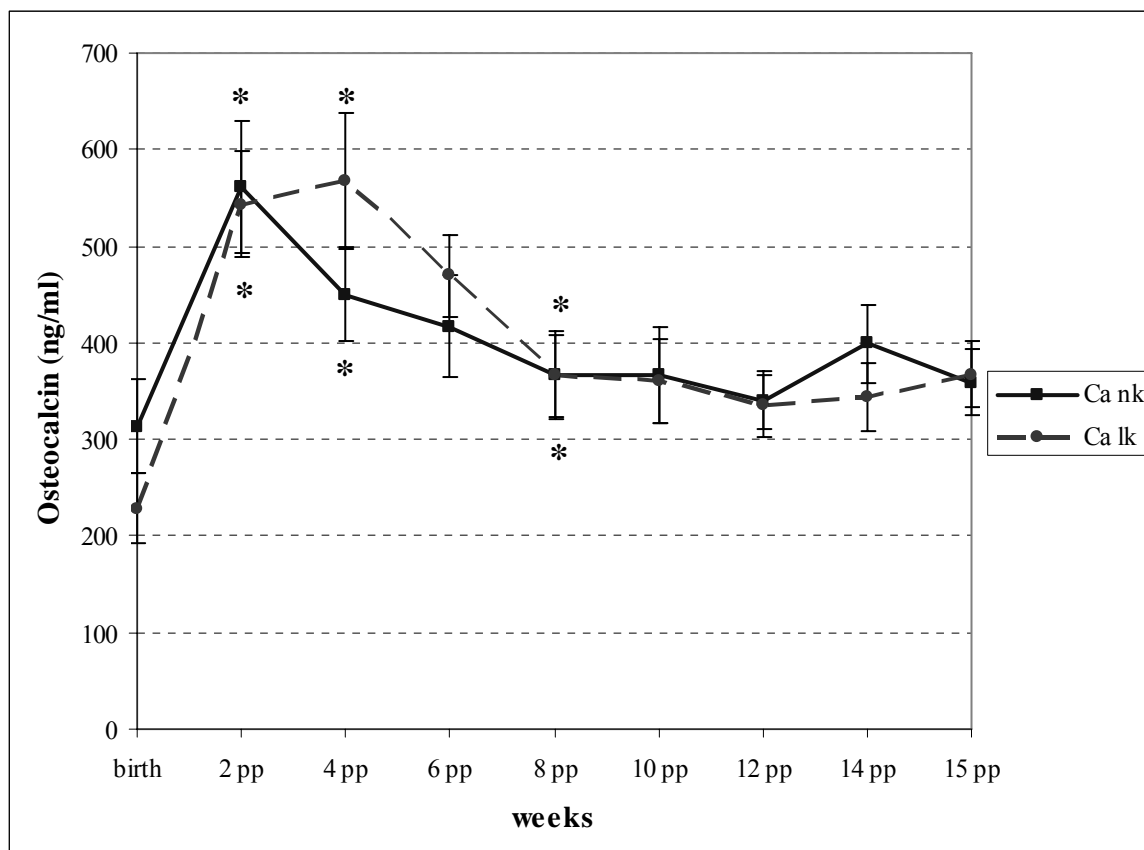


Fig. 10 Mean (\pm SE) crosslinked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) concentrations in serum in goat kids. * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goat kids ($p \leq 0.05$). See Fig. 9 for key.

In goat kids the BMD correlates significantly with the bone mineral content (BMC) ($R^2 = 0.7749$; $p = 0.0001$). The BMD showed significant differences between the two feeding trials, but not as a result of the 1,25VitD injection. In the Ca nk group the total BMD (diaphysis) was always significantly higher ($p < 0.003$) compared to the Ca lk group (Fig. 11). There were also significant differences within time, i.e. from 4th to 6th w pp ($p = 0.014$), from 4th to 8th w pp ($p = 0.039$), from 6th to 10th w pp ($p = 0.031$), from 4th to 14th w pp ($p = 0.017$) and from 14th to 15th w pp ($p \leq 0.05$).

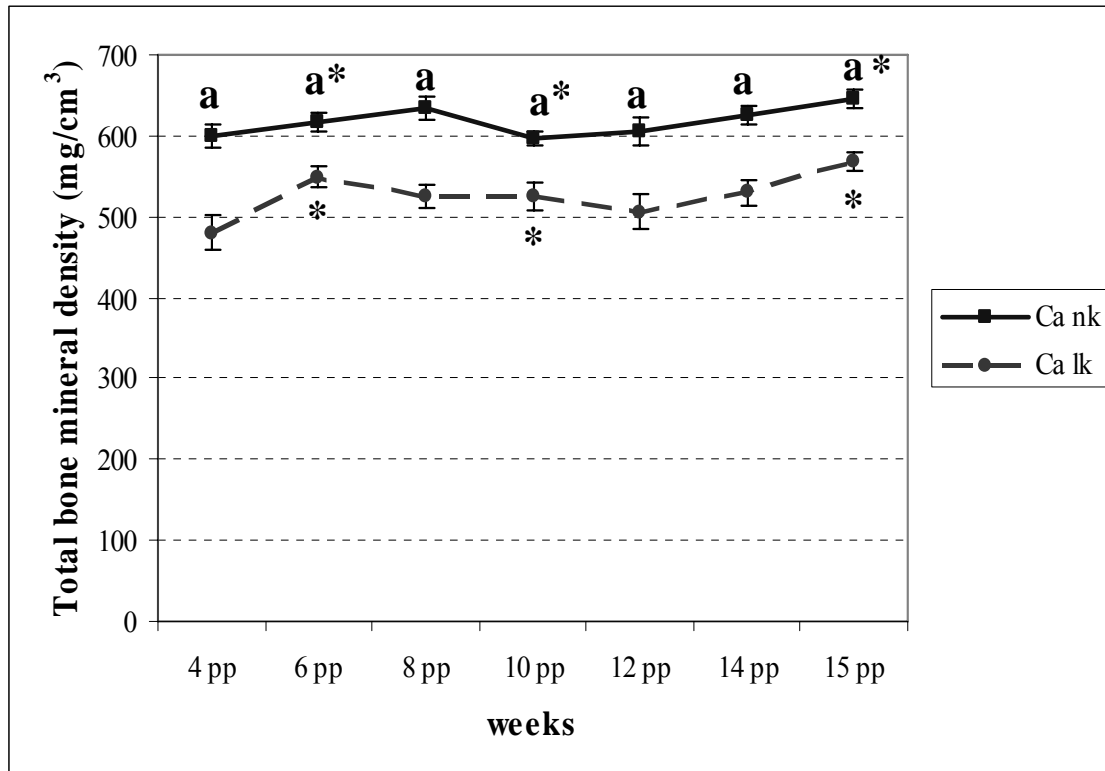


Fig. 11 Total bone mineral density (BMD, diaphysis) (Mean \pm SE) during a 9-week lasting feeding trial in goat kids ($n=11$ for each group; Ca nk=normal calcium concentration goat kid; Ca lk=low calcium concentration goat kid); metatarsus was measured at 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 15th week post partum. Letter “a” indicates significant differences between Ca nk and Ca lk ($p \leq 0.05$). * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goat kids ($p \leq 0.05$).

In the kids the total distal BMD (measurement of the metaphysis) showed significant differences between the two feeding groups from 4th to 10th w pp ($p < 0.04$) whereas the Ca nk group always had higher values (Fig. 12). Significant differences were seen in time. From 4th to 6th w pp a decrease ($p = 0.04$), from the 6th w pp to 10th w pp and 10th to 15th w pp an increase were observed ($p \leq 0.05$) and the highest measurement at the 15th w pp ($p \leq 0.05$).

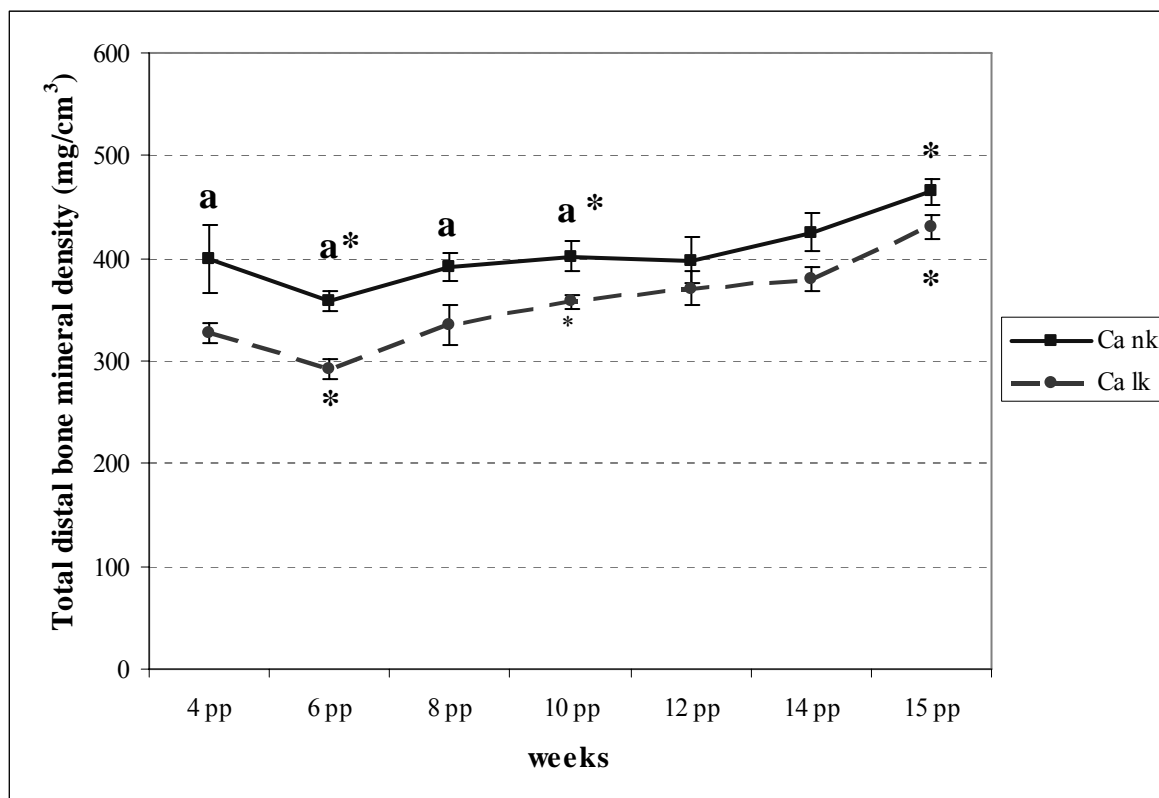


Fig. 12 Total distal bone mineral density (BMD, metaphysis) (Mean \pm SE) in goat kids. Letter “a” indicates significant differences between Ca nk and Ca lk ($p \leq 0.05$). * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goat kids ($p \leq 0.05$). See Fig. 11 for key.

Furthermore for cortical BMD (diaphysis) significant differences were measured from 4th to 12th w pp ($p < 0.03$) within the groups, i.e. higher values in the Ca ng group. A significant increase from 4th to 6th w pp ($p < 0.0001$) was measured. A significant decrease from 6th to 8th w pp ($p = 0.033$) was observed and thereafter similar values to the end of trial were shown (Fig. 13).

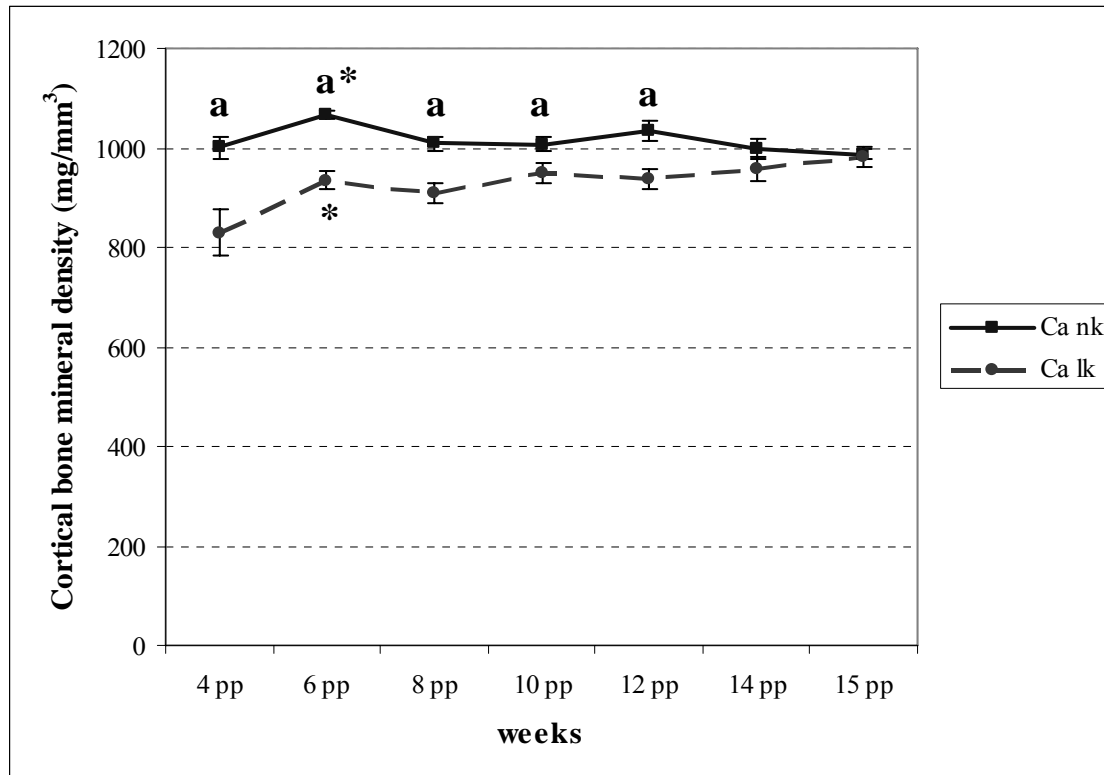


Fig. 13 Cortical bone mineral density (BMD, diaphysis) (Mean \pm SE) in goat kids. Letter “a” indicates significant differences between Ca nk and Ca lk ($p \leq 0.05$). * Indicates significant differences between the time point before to time point after within goat kids ($p \leq 0.05$). See Fig. 11 for key.

Ussing chamber

Mucosal to serosal Ca flux rates (J_{ms}) exceeded respective flux rates in the opposite direction (J_{sm}) in the rumen. This resulted in net Ca flux rates ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$) ranging between +6 to +7 nmol/cm²/h in rumen. In the Ca nk group the J_{ms} and J_{sm} flux rates were higher compared to the Ca lk group in rumen. In the duodenum of the kids without 1,25VitD injection net Ca flux rates ranged between -9 to -5 nmol/cm²/h and in kids with 1,25VitD injection around +0.5 nmol/cm²/h. The flux rates were however not significantly different between the groups in rumen ($p = 0.927$) and in duodenum ($p = 0.190$) (Table 6).

Table 6 Electrical properties, unidirectional (sm=serosal-mucosal; ms=mucosal-serosal) and netto fluxe-rates in nmol*cm⁻²*h⁻¹ ($J_{net}=J_{ms}-J_{sm}$); means \pm SE; no significant group effect ($p > 0.05$)

duodenum				
	Ca nk	Ca nkVitD	Ca lk	Ca lkVitD
ms fluxe	30.85 \pm 3.84	15.14 \pm 2.43	21.35 \pm 3.33	22.31 \pm 2.13
sm fluxe	32.66 \pm 5.42	19.17 \pm 2.12	30.29 \pm 3.69	25.87 \pm 4.70
netto fluxe	-3.54 \pm 4.17	0.32 \pm 1.98	-8.94 \pm 3.18	0.49 \pm 4.41
rumen				
	Ca nk	Ca nkVitD	Ca lk	Ca lkVitD
ms fluxe	14.18 \pm 2.38	11.06 \pm 2.85	9.21 \pm 1.89	8.25 \pm 2.95
sm fluxe	6.78 \pm 2.68	3.74 \pm 1.12	2.95 \pm 0.81	2.62 \pm 1.12
netto fluxe	6.92 \pm 2.23	7.31 \pm 1.97	6.26 \pm 1.43	5.64 \pm 1.92

nk=normal calcium concentration goat kid, n=5; nkVitD=normal calcium concentration and 1,25VitD injection, n=6; lk=low calcium concentration goat kid, n=6; lkVitD=low calcium concentration and 1,25VitD injection, n=5.

VDR

VDR immunoreactivities were exposed as brown staining in the nuclei in all segments of the intestines of the goat kids, i.e. duodenum (DD), jejunum (JJ), ileum (IL), caecum (CC) and colon (CO) (Fig. 14 and 15). Goblet cells were always devoid of any specific immunoreaction and thus not considered in the present study. This brown coloration was of varying degree and thus indicative of more or less high VDR concentrations within all other cell types present within the epithelium of crypts (basal gland=BG, indermediaer gland=IG, superficial gland=SG) or the intestinal luminal surface epithelium (superficial epithelium=SE). Nuclear immunostaining was present in all segments of the intestine while immunoreactivities were highest in the duodenum compared to the distal segments of the intestine. Immunoreactive score of the Ca nk group did not differ significantly from data obtained from the Ca lk group neither did the 1,25VitD injection show any effect on the immunoreactivities of VDR ($p = 0.454$). Intestinal VDR-IRS of BG decreased significantly from higher levels in duodenum and jejunum to lower levels in ileum, caecum and colon. Mean VDR-IRS (BG+IG+SG+SE/4) differed significantly between all segments (DD > JE > CO > IL > CC; $p \leq 0.05$) (Table 7).

Differences between the cell types – basal, intermediate and superficial glandular/crypt epithelial cells and surface epithelial cells – within an intestinal segment were significant for DD (BG, IG > SG > SE; $p \leq 0.05$), JE, IL (BG, IG > SG > SE; $p \leq 0.05$) and CC, CO (IG > BG, SG > SE; $p \leq 0.05$). VDR immunoreactivities were not observed in the forestomach in the tissues of goat kids.

Table 7 Vitamin D receptor immunoreactive scores (VDR-IRS) (mean \pm SE) of the various cell types within the epithelial layers of the different segments of goat kids intestines.

Layer	Ca nk	Ca nkVitD	Ca lk	Ca lkVitD	Mean
DD BG	1190 \pm 209	1439 \pm 133	1432 \pm 193	1576 \pm 229	1412 \pm 92 ^{1,a}
DD IG	1102 \pm 202	1395 \pm 132	1335 \pm 209	1407 \pm 243	1315 \pm 95 ^{1,a}
DD SG	316 \pm 120	288 \pm 66	243 \pm 54	263 \pm 77	276 \pm 37 ^{2,a}
DD SE	59 \pm 9	138 \pm 36	94 \pm 30	110 \pm 47	102 \pm 17 ^{2,a}
Mean DD					776 \pm 53 ^a
JJ BG	831 \pm 159	797 \pm 175	1288 \pm 213	1086 \pm 301	1004 \pm 109 ^{1,a}
JJ IG	878 \pm 214	589 \pm 141	1144 \pm 216	1017 \pm 308	903 \pm 112 ^{1,b}
JJ SG	201 \pm 78	128 \pm 12	315 \pm 86	248 \pm 76	223 \pm 35 ^{2,b}
JJ SE	52 \pm 16	87 \pm 26	172 \pm 54	60 \pm 21	96 \pm 19 ^{3,b}
Mean JJ					557 \pm 65 ^b
IL BG	143 \pm 30	224 \pm 70	237 \pm 55	260 \pm 116	221 \pm 35 ^{1,b}
IL IG	137 \pm 21	242 \pm 40	306 \pm 63	263 \pm 90	245 \pm 30 ^{1,b}
IL SG	62 \pm 13	118 \pm 14	97 \pm 22	88 \pm 23	94 \pm 10 ^{2,b}
IL SE	33 \pm 8	104 \pm 29	36 \pm 8	91 \pm 53	68 \pm 16 ^{3,b}
Mean IL					157 \pm 20 ^c
CC BG	72 \pm 22	51 \pm 23	159 \pm 59	89 \pm 28	94 \pm 20 ^{1,c}
CC IG	219 \pm 44	138 \pm 39	355 \pm 87	212 \pm 65	232 \pm 34 ^{2,c}
CC SG	83 \pm 10	126 \pm 15	130 \pm 52	102 \pm 18	112 \pm 15 ^{1,a}
CC SE	17 \pm 11	39 \pm 15	43 \pm 29	38 \pm 17	35 \pm 9 ^{3,b}
Mean CC					118 \pm 18 ^d
CO BG	93 \pm 33	191 \pm 84	269 \pm 91	170 \pm 38	185 \pm 36 ^{1,b}
CO IG	252 \pm 54	603 \pm 171	582 \pm 152	394 \pm 63	470 \pm 68 ^{2,b}
CO SG	105 \pm 12	243 \pm 82	160 \pm 22	144 \pm 41	166 \pm 26 ^{1,a}
CO SE	17 \pm 11	30 \pm 11	27 \pm 12	5 \pm 2	20 \pm 5 ^{3,c}
Mean CO					210 \pm 30 ^e

BG, IG, SG=basal, intermediate, superficial glandular cells; SE=surface epithelium; DD=duodenum; JJ=jejunum; IL=ileum; CC=caecum; CO=colon; Mean values with different letters within the right column, i.e. between the different intestinal segments differ significantly ($p \leq 0.05$); Mean values with different cyphers within the right column, i.e. between the different epithelia differ significantly ($p \leq 0.05$); No significant group effect was observed ($p > 0.05$)

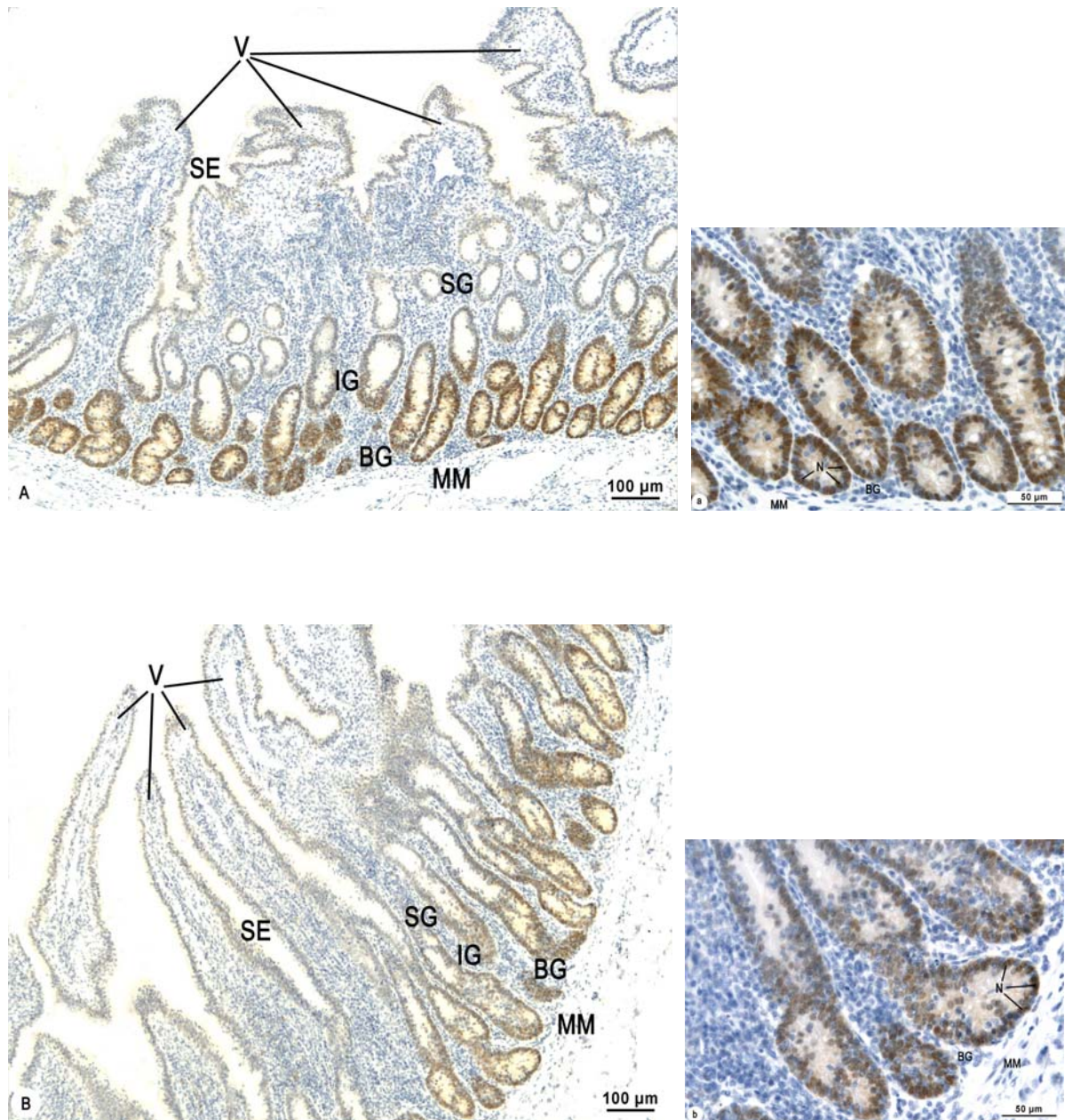


Fig. 14 VDR immunohistochemistry in goat kids duodenum (DD; A, a) and jejunum (JJ; B, b); VDR immunoreaction is demonstrated as brown staining and contrasts well with the blue counterstaining of the nuclei. DD (A) and JJ (B) exhibit a clear gradient in VDR immunostaining. Strong reactions are visible in BG. IG, SG and SE and demonstrate a stepwise reduced immunostaining, respectively. Small inlets (a, b) show the BG marked with an asterisk at a higher magnification to underline the decreasing VDR immunoreaction along the length of the small intestine and the cytoplasmic staining in DD and JJ. SE=superficial epithelium; SG=superficial glandular cells; IG=intermediaer glandular cells; BG=basal glandular cells; MM=lamina muscularis mucosae; M=tunica muscularis; V=intestinal villi; N=nucleus

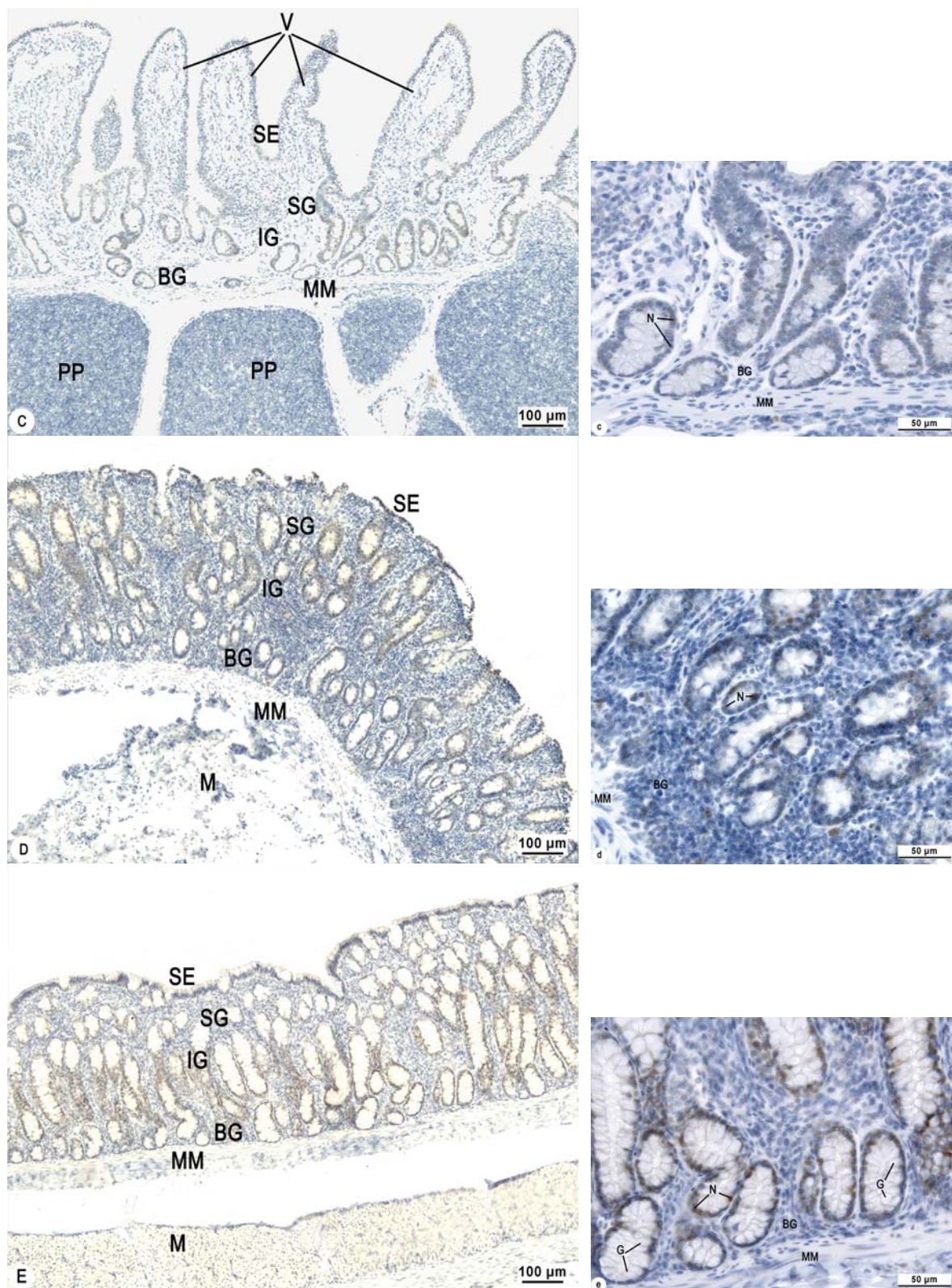


Fig. 15 VDR immunohistochemistry in goat kids ileum (C, c), caecum (D, d) and colon (E, e). C-E generally exhibit weaker immunoreactions as compared to DD and JJ. Goblet cells (G) (marked only in e) are always devoid of VDR; see Fig. 14 for key.

Calbindin D9k

Calb9k was histochemically detectable and therefore assessed quantitatively in tissues of the caprine gastrointestinal tract, in forestomach, i.e. rumen (RU), psalter (PS), reticulum (RET), abomasums (ABO) and in intestine, i.e. duodenum (DD), jejunum (JJ) and ileum (IL) (Fig. 16-19). There were no immunohistochemical reactions in the large intestine, i.e. caecum (CC) and colon (CO), in all kid groups. In the forestomach the reaction always was at the superficial epithelium. In forestomach no significant differences could be detected between the kid groups. In intestine reactions were not evident in all intestinal sections, but in all groups for DD and JJ. The DD showed a significant higher expression than the JJ ($p = 0.003$). There are significant differences within groups ($p = 0.023$) and within different parts of intestinal sections ($p < 0.0001$). The highest immunoreactivities were found in the duodenal surface epithelium. Between the different layers of DD significant differences were obtained ($p < 0.0001$): DD SE > DD SG > DD BG (SE: surface epithelium; SG superficial gland, BG: basal gland). This is also true for the jejunum: JJ SE > JJ SG > JJ BG (SE/SG and SE/BG $p = 0.0001$; SG/BG $p = 0.012$). Significant differences were also observed in JJ SG ($p = 0.007$) and JJ BG ($p = 0.010$) between the different kid groups.

The Ca lk group showed significant differences in the JJ SG and JJ BG compared to the Ca lk group with 1,25VitD injection ($p = 0.037$). Also in Ca nk group was measured significant different values in JJ SE ($p = 0.043$) than the Ca nk group with 1,25VitD injection. The most important significant differences were obtained in the JJ SG, JJ BG and IL SE because only the groups with 1,25VitD injection showed an immunoreaction ($p = 0.013$) (Table 8).

Table 8 Cytoplasmic Calb9k extinction values (mean \pm SE) of the various cell types within the epithelial layers of the different segments in gastrointestinal tract in goat kids

Layer	Ca nk	Ca nkVitD	Ca lk	Ca lkVitD	Mean
reticulum	1.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0
rumen	1.4 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.0
psalter	1.4 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0
abomasum	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.0	1.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.0	0.9 \pm 0.2
DD SE	2.6 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	2.8 \pm 0.1 ^{1,a}
DD SG	1.7 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.0 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1 ^{2,b}
DD BG	1.4 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1 ^{2,b}
JJ SE	1.5 \pm 0.1	3.0 \pm 0.2	1.9 \pm 0.4	2.5 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3 ^{1,b}
JJ SG	0	1.8 \pm 0.1	0	1.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.0*
JJ BG	0	1.4 \pm 0.0	0	1.6 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0*
IL SE	0	1.3 \pm 0.1	0	1.2 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0*
IL SG, BG	no immunohistochemical reaction				
CC, CO	no immunohistochemical reaction				

BG=basal glandular cells SG=superficial glandular cells; SE=surface epithelium; DD=duodenum; JJ=jejunum; IL=ileum; CC=caecum; CO=colon; Mean values with different letters within the right column, i.e. between the different intestinal segments differ significantly ($p \leq 0.05$); Mean values with different cyphers within the right column, i.e. between the different epithelia differ significantly ($p \leq 0.05$); *significant group effect ($p \leq 0.05$)

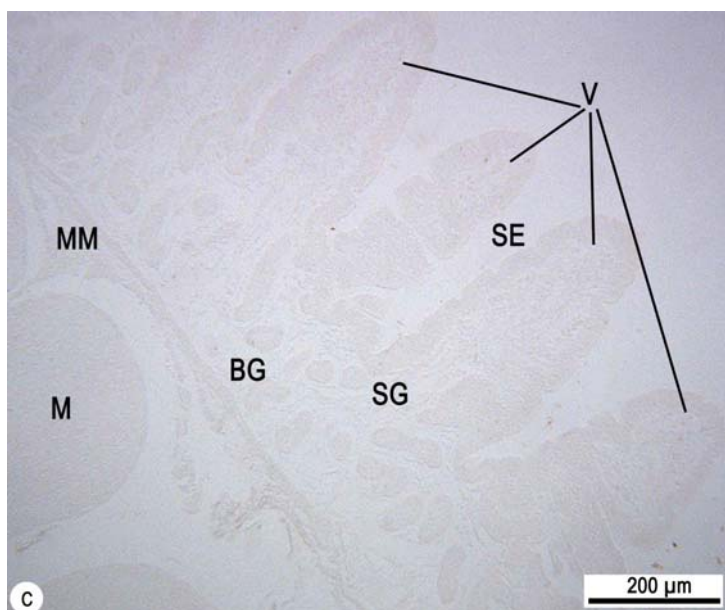
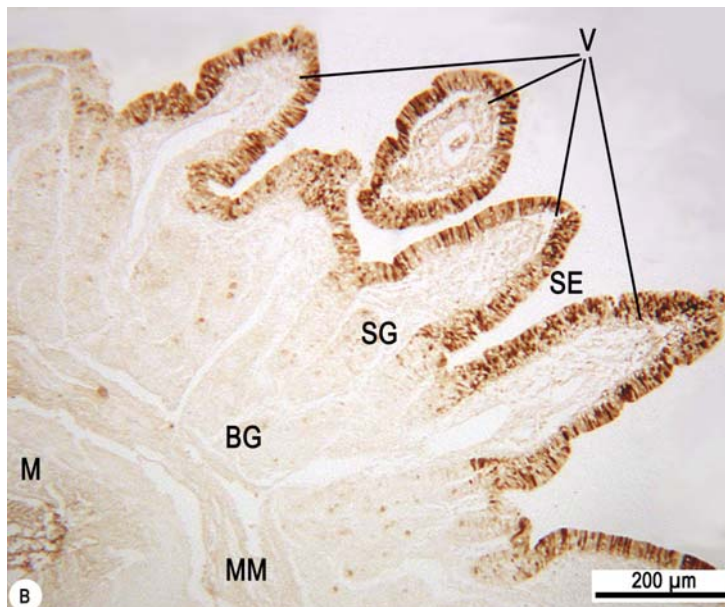
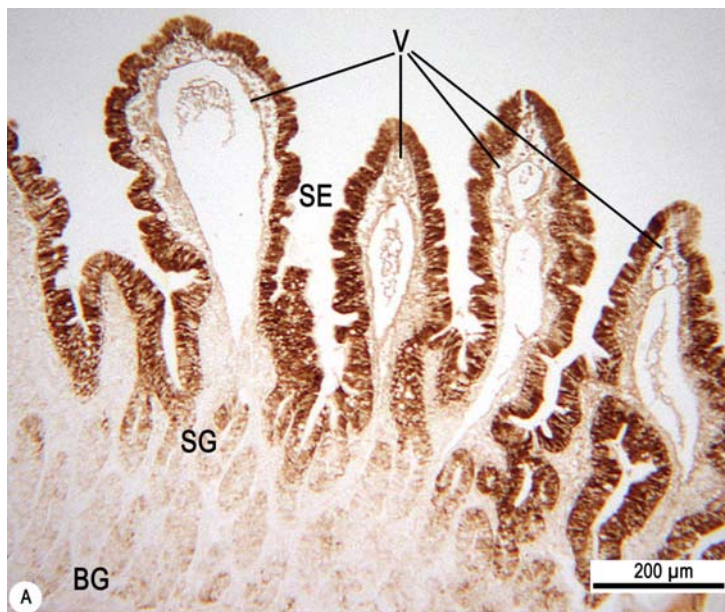
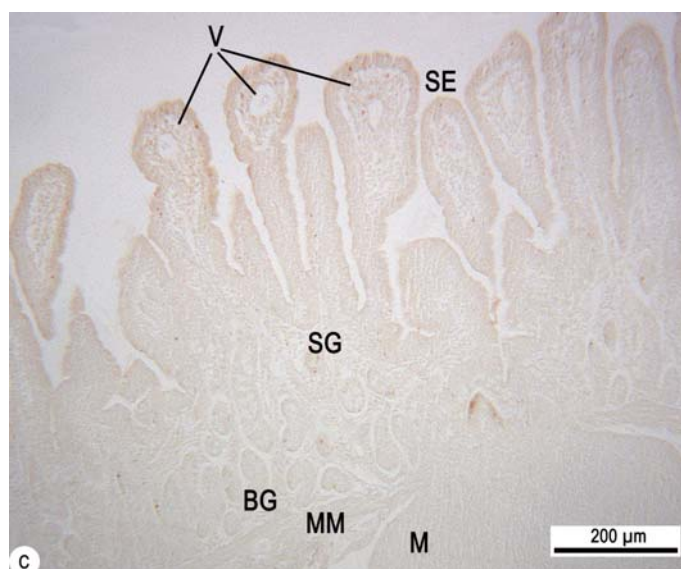
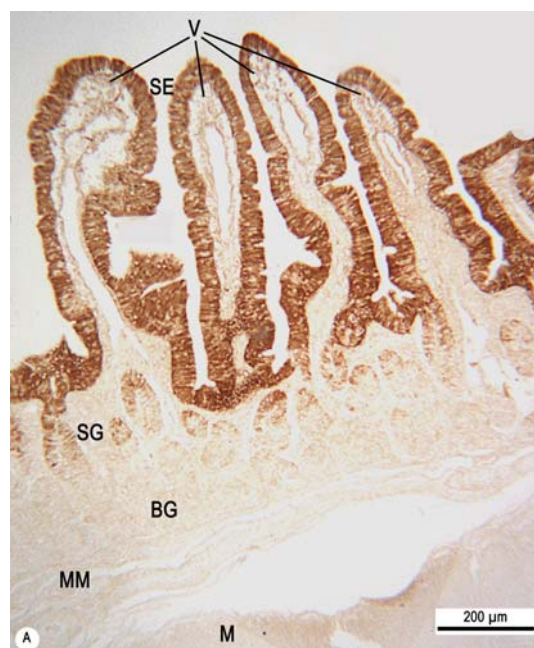


Fig. 16 Calb9k immunoreactions in duodenum (A), jejunum (B) and ileum (IL) of a goat kid without vitamin D injection. Calb9k immunoreaction is demonstrated as brown staining without background staining. DD and JJ (A, B) exhibit a clear gradient in Calb9k immunostaining. Strong reaction is visible in SE. SG and BG demonstrate a stepwise reduce immunostaining, respectively. The IL showed no Calb9k immunoreaction. SE=superficial epithelium; SG=superficial gland; BG=basal gland; MM=lamina muscularis mucosae; M=tunica muscularis; V=intestinal villi

Fig. 17 Calb9k immunoreactions in duodenum (A), jejunum (B) and ileum (IL) of a goat kid with vitamin D injection. Calb9k immunoreaction is demonstrated as brown staining without background staining. In DD, JJ and IL (A, B, C) exhibits a clear gradient in Calb9k immunostaining. Strong reaction is visible in SE. SG and BG demonstrate a stepwise reduce immunostaining, respectively. See Fig. 16 for key.



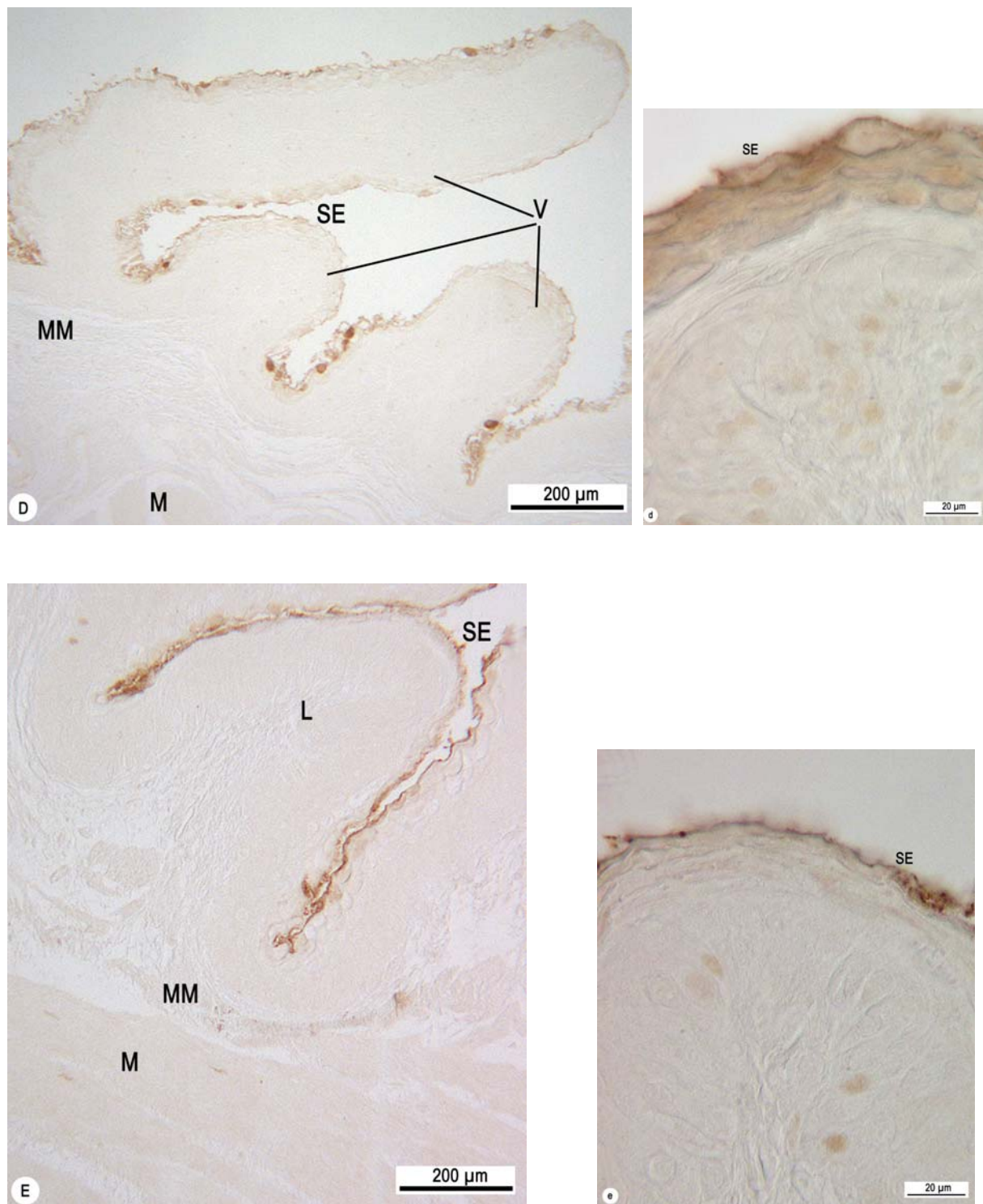


Fig. 18 Calb9k immunoreactions of a goat kids rumen (D) and psalter (E). Calb9k immunoreaction is demonstrated as brown staining without background staining. Small inlets (d, e) show the SE at a higher magnification to underline the decreasing Calb9k immunoreaction in forestomach. SE=superficial epithelium; SG=superficial gland; BG=basal gland; MM=lamina muscularis mucosae; M=tunica muscularis; V=intestinal villi, L=omasal leave.

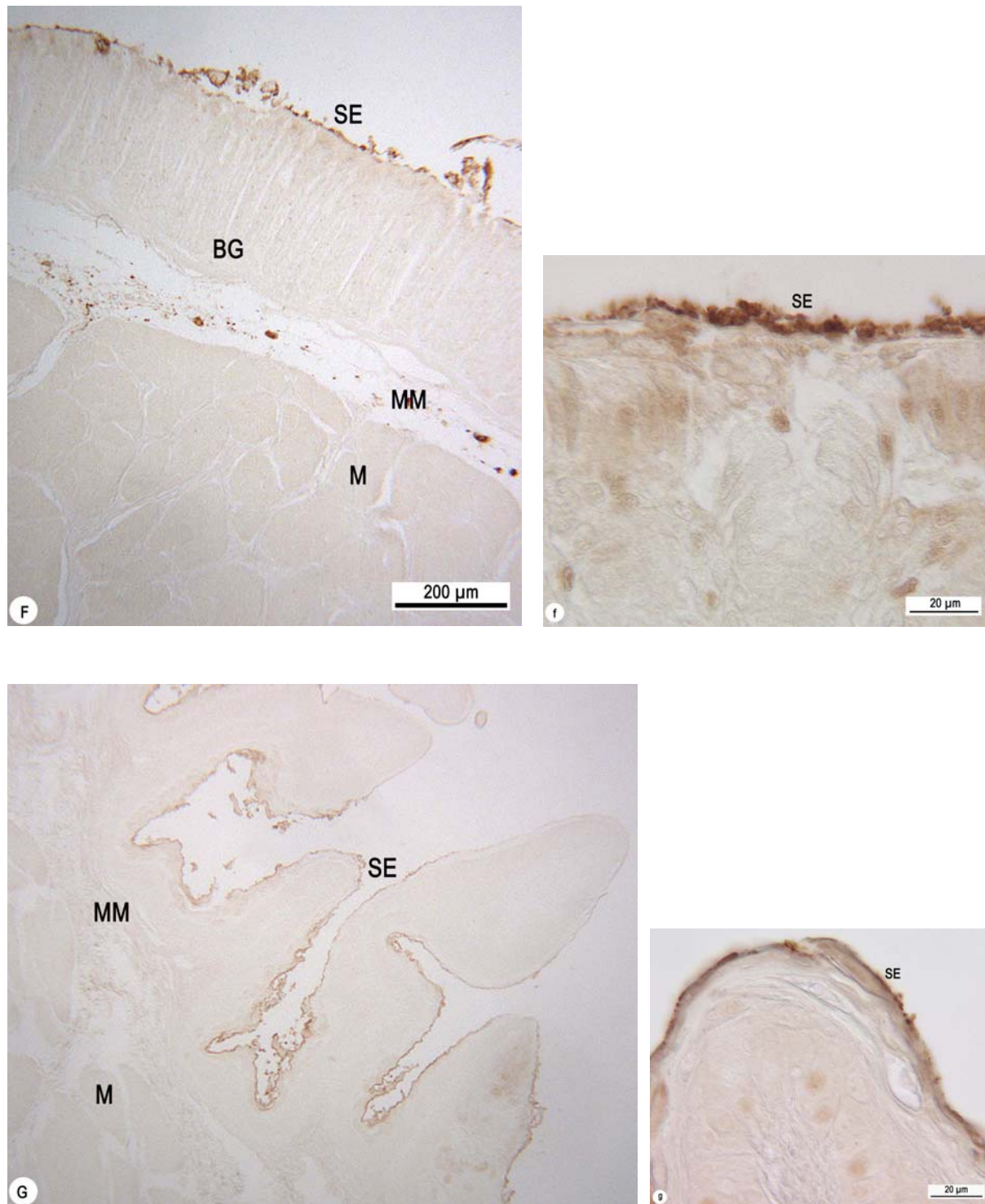


Fig. 19 Calb9k immunoreactions of a goat kids abomasum (F) and reticulum (G). Calb9k immunoreaction is demonstrated as brown staining without background staining. Small inlets (f, g) show the SE at a higher magnification to underline the decreasing Calb9k immunoreaction in forestomach. See Fig. 18 for key.

Discussion

In the present study, the goats were fed on a Ca normal or Ca low diet 4 w ap to 6th w pp (weaning), the kids were in the same feeding regiment as their mothers for 9 weeks. In the study the Ca concentrations always stayed within the normal reference range in all animals^{53,54}. This was also shown in other studies^{37,55}. There may have been a decrease of Ca around parturition as previously been shown in goats⁵⁶ and cows^{57,58} but since samples were not taken daily in the present study, this could not be confirmed.

In goats, mean 1,25VitD concentrations increased during late gestation in both feeding groups. This increase in serum 1,25VitD levels may have resulted from decreased Ca concentrations in serum, which was not measured because of sampling, maybe due to the fact that homeostatic mechanism already led to normal Ca levels. This induced an increase of active Ca absorption from the gastrointestinal tract. After birth the serum Ca levels of the animals seem to adapt to the high Ca requirement. Probably enough Ca is absorbed in the intestine (active and passive transport) from the feedstuffs and/or enough Ca was mobilized from bone, additionally. This was also seen in goats, sheep⁵⁶ and cows^{37,58}. In the Ca lg group, the 1,25VitD levels in serum increased from birth to 2nd w pp. It seems that Ca needs to be absorbed for a longer time in the Ca lg group in order to balance the Ca deficit around birth. In goats, ICTP and OC concentrations showed an oppositional development of the concentrations at birth. Ca is reabsorbed from bone independently of the feeding regime to adapt to the higher demand of Ca, i.e. for the growing fetus and lactation. The Ca lg had a significantly higher bone resorption activity at birth and a higher bone formation rate in lactation compared to the Ca ng group. During ongoing lactation the balance between bone formation and –resorption is re-established since Ca seems to be absorbed sufficiently from feedstuffs. The reason of the higher bone formation in the Ca lg group remains unclear. In another study with goats, where high Ca versus normal Ca was tested was also seen a high bone formation around birth⁵⁶. Bone remodelling is based on two counteracting processes: bone formation and bone resorption. During late pregnancy and early lactation the pathways are uncoupled. In this and other trials bone mass decreased in goats before birth independently of Ca intake³⁷. The bone resorption marker ICTP showed an increase to birth and a decrease after birth in Ca ng and Ca lg group. The resorption and the high need of Ca around birth for the foetus and the milk is nearly the same for the Ca lg and the Ca ng group in this study. The bone formation marker OC and the BMD increased immediately after birth and 6 w pp in Ca ng group. Furthermore, in Ca ng group the 1,25VitD decreased after birth because there is no

need for additional Ca absorption in this time of the reproductive cycle. In the Ca lg group the bone formation marker OC increased after birth and the BMD further decreased to the 6th w pp. The longer stimulation of 1,25VitD synthesis in the Ca lg group from birth to the 2nd w pp seems not to compensate for the Ca deficit around birth as a result of low Ca feeding. It is an evidence that 1,25VitD influenced the bone during the time of high Ca need. Maybe there is an adaptation after the 6th w pp and recovering of bone but there are missing data in this study from the goats.

In goat kids the 1,25VitD concentrations decreased after 2nd w pp. Interestingly Ca serum levels stayed within normal range in all groups although 1,25VitD was higher in Ca nk group at birth and 2nd w pp which was, however, expected in the Ca lk group. There maybe a better intestinal absorption with high Ca intake in goat kids in contrast to other animals. Schröder⁵⁵ measured significantly higher values of 1,25VitD in Ca depleted male growing goats in comparison to Ca normal group.

Additionally the gastrointestinal Ca absorption changed with the feedstuffs, i.e. from milk to solid feedstuff (hay/concentrate). Serum 25VitD concentrations also seem to change within the different feeding periods in goat kids. The increases of 1,25VitD and 25VitD reflect the effect of 1,25VitD injections in kids. The significant difference of 25VitD represents this parameter as evidence for the vitamin D status⁵⁹.

In goat kids there is clear evidence that the level of Ca intake initially influenced bone metabolism. But with time, there was an adaptation to Ca feeding regiments in kids. The diaphysis seems to store readily available Ca than the epiphysis which showed an adaptation to the different Ca requirement in the groups. ICTP, OC and 1,25VitD concentrations increased in the first two weeks of life in all goat kids and in the Ca lk group OC increased from birth to the 4th w pp. It is possible that the low Ca diet of goats (feeding 4 w ap) influenced the kids. The first weeks of life possibly are predominant for bone metabolism and development in goat kids. Kajantie et al.⁶⁰ observed in infants increased ICTP concentrations by 2 w of age and thereafter decreased concentrations. In infants and children the ICTP concentration is higher than in adults, reflecting the high growth rate; degradation of type I collagen is an essential aspect of normal skeletal growth⁶¹. ICTP, OC and 1,25VitD showed similar values after the 4th w pp in all kid groups. Furthermore, there may be a better adaptation to different Ca supplies because of growing and adaptation in growing kids in contrast to adult goats. Since in other animals, like growing dogs, bone diseases (less bone mineralisation, fractures) are correlated with low Ca intake⁶². There are no long term feeding studies in growing goats in which low Ca diets were fed. Liesegang and Risteli³⁷ observed no

effects of Ca supply on bone (BMD and BMC) in goat kids and lambs when high Ca content vs. normal content were tested. In long-term studies with adolescent humans, it was shown that the BMD increased with an adequate Ca intake plus supplementation of Vitamin D compared to young girls with no treatment^{63,64}. Additionally, calcium alone increased bone mass in older humans⁶⁵.

In all kid groups a high positive netto flux rate (netto-absorption) for Ca was measured in rumen in the Ussing chambers. It can be concluded that the rumen is a main site for active transport mechanisms for Ca in growing goat kids. Previous studies described Ca netto-absorption before duodenum in single- and multi-fistulated ruminants⁶⁶⁻⁶⁸. Schröder et al.^{32,33} and Höller et al.⁶⁹ measured active mechanisms in caprine and ovine rumen by Ussing chamber technique. Furthermore in sheep rumen active Ca fluxes were observed, but there was no influence of Ca supply or 1,25VitD⁵⁰. In contrast, studies in monogastric animals have shown that active Ca absorption is stimulated in response to Ca intake and this effect is mediated by 1,25VitD^{70,71}. Low dietary Ca intake led to a significant stimulation of active Ca absorption by more than 50% in rumen of growing goats, but not in sheep³³. In contrast, in the present study, no increase of 1,25VitD and flux rates in dietary Ca depleted growing goats could be demonstrated. Also the vitamin D injection showed no effect on Ca absorption in rumen of goat kids. In duodenum negative netto flux rates of Ca were measured in groups not injected with vitamin D. There is evidence to a low absorption of Ca in duodenum in goat kids with vitamin D injection but there is a need for more research. Also in monogastric species, e. g. pigs³² and rats⁷², active Ca absorption from the upper small intestines was stimulated by 1,25VitD. Schröder et al.³³ observed in duodenum of goat kids an increase of net Ca absorption independent of Ca supply after Vit D injection. It is possible that 1,25VitD changes Ca absorption in the upper small intestine. Schröder et al.⁵⁵ assumed that the duodenal mucosa is an optional target organ of 1,25VitD in goats. But the mechanisms in rumen are still unclear.

The results of the present immunohistochemical study in growing goats demonstrated that VDR are present in all intestinal segments as also shown in earlier studies^{36,73-76}. Vitamin D receptor immunoreactivities were prominent in duodenal mucosa, lower in jejunum and colon, further declined in ileum and were lowest in caecum. The results indicate that VDR are highly expressed at the site of active, Vit D-dependent intestinal Ca absorption. Level of Ca intake as well as 1,25VitD injections had no influence on VDR-immunoreactions. Interestingly there were no immunohistochemical reactions of VDR in forestomach, but a clear active netto flux rate of Ca was shown in the Ussing chamber. This active transport seems to be Vit D

independent since Calb9k is expressed in the forestomach but to this time it is not clearly understood.

The present study shows to the author's knowledge, for the first time, the expression of the Ca binding protein, Calb9k, in caprine gastrointestinal tissues. Calb9k was detected immunohistochemically in the forestomach and intestine of growing goats. Duodenum and jejunum exhibited an immunohistochemical staining for Calb9k in all kid groups. Interestingly, goat kids with vitamin D injection showed an immunohistochemical reaction in jejunum and ileum which were, however, not detectable in non-injected animals at these sites. There were two significant differences of Calb9k amounts: a proximal to distal decrease within the intestinal segments based mainly on high Calb9k in surface epithelium and superficial glandular to basal glandular epithelial cells decreases within the segment. The distribution pattern of Calb9k protein demonstrated in the present study was generally in accordance with several reports on calbindin expression in duodenum of cows, mice and goats^{23,32,77,78}.

It was suggested that the expression of VDR may be correlated with the stage of differentiation of the enterocytes in the chicken intestine⁷⁹. In this study VDR immunoreactivity was localized mainly in nuclei of epithelial cells and was more abundant in the crypt than in the villus cells. Calbindin was found predominantly in villus-tip cells in normal rat duodenum^{80,81}. Ca transport was approximately twofold greater in villus-tip than in crypt cell-fraction basolateral membranes though the affinity of the uptake for Ca was similar in rats⁸². It may be concluded that Calb9k and ATP-dependent Ca-transport are most prominent in absorbing villus cells and the vitamin-D dependent Ca absorption takes primarily place in these cells⁸¹.

In the present study the enterocytes displayed the highest VDR-IRS in the basal and intermediate glandular cells and the highest Calb9k reactivities in the surface epithelium. The surface epithelial cells have a very short lifetime and on that account the receptors in surface epithelium would not be effective for long periods of time. The surface epithelial cells which develop from dividing stem cells deep in the glands, differentiate when they move to the neck of the glands, are integrated into the surface epithelium, and scale off after apoptosis. Results of Walters and Weiser⁸³ supported the opinion that mature enterocytes have the greatest capacity for transcellular movement of calcium. Furthermore, their findings showed that partially differentiated mid-villus cells have the capacity to respond most rapidly to 1,25VitD. The villus-tip cells have differentiated to a point where they are no longer able to synthesize additional proteins for Ca absorption⁸³. Freeman et al.⁸⁴, using in situ hybridisation, presented

the most number of PMCA1 in the enterocytes-crypts and basal cells. Consequently, essential active Ca absorption is shown by this correlation of the ligand-active transcription factor VDR and the Ca pump PMCA1. In duodenum and jejunum TRPV6 has been shown to be colocalized with Calb9k in villus-tip cells^{85,86}. Also Weber et al.⁸⁷ presented a colocalisation of TRPV6 and Calb9k, suggesting that apical TRPV6 and intracellular Calb9k are interrelated in a system controlling Ca entry and intracellular Ca concentrations in intestine.

Controversially, Benn et al.³⁰ indicated that active intestinal Ca absorption occurs in the absence of TRPV6 and Calb9k in mice. Akhter et al.²⁹ supported an alternative pathway for intestinal Ca absorption and intracellular Ca diffusion that does not require intestinal calbindin. There is an evidence that calbindin has another role in the intestine, for example as a modulator of Ca channel activity and/or as an intracellular Ca buffer³⁰. These theses in monogastric animals may also be a possible explanation for the mechanism in the rumen in ruminants. The assumption of vitamin D-sensitive Ca absorption is supported by the detection of VDR and Calb9k in goat small intestine^{55,88}. In sheep, VDR and Calb9k were found in the jejunum⁵⁰ and the presence of TRPV5 and TRPV6 in duodenum and jejunum could be demonstrated with in situ hybridization technique¹⁹. In this study, TRPV6 expression was higher in jejunum than in duodenum¹⁹. It seems that the jejunum is more important than duodenum for active Ca absorption in sheep³³. In contrast, Riner et al.⁷⁵ and the present study showed that the duodenum is more important for Ca absorption in goats. The treatment with 1,25VitD had no effect on the pre-intestinal Ca absorption, but an increase of Calb9k in small intestine presented in the jejunum and ileum. These findings proved that intestinal Calb9k transcription was stimulated by the binding 1,25VitD to its receptor and the activation of the complex thereafter. The daily Ca intake seems to be important for active and passive mechanism, respectively. Active Ca absorption is dominant at conditions of low Ca intake¹⁴ and passive mechanism is more prominent when high Ca amounts are present in the feedstuff⁸⁹. But the high Ca intake could not be proved in the present study.

In the current study the results in the Ussing chamber revealed an active Ca absorption in the rumen, although, in rumen only Calb9k, but not VDR were detected by immunohistochemical methods. In duodenum there was an evidence for active Ca absorption after Vit D injection obtained by Ussing chamber. The immunohistochemical methods revealed intestinal VDR and Calb9k in the gastrointestinal tract in goat kids.

Conclusions

In conclusion, pregnancy is characterized by a high bone turnover independent of Ca intake. During late gestation and early lactation bone remodelling are uncoupled with significant decreases in bone mineral density. Growth is characterized by bone remodelling and will be influenced by the milk and later the feedstuffs, calcium and vitamin D intake, the movement and genetic endowments.

These data showed that low Ca supply in small ruminants leads to higher bone resorption rates in the mothers whilst on this feeding regime during late gestation and early lactation. There is clear evidence for the rumen as a main site for Ca absorption in growing goats. The results of this study indicate that VDRs are highly expressed at the site of maximal intestinal Ca absorption. The active absorption may not play such an important role in the duodenum as there was also active transport evident in the rumen. In rumen it seems to be Vit D-independent but there is a need for more research. The results of this study indicate that VDR and Calb9k are highly expressed in the duodenal mucosa. Nuclei of enterocytes stained positively for VDRs with the strongest immunoreactions in intermediate and basal glandular cells. Calb9k revealed most intensive staining in the surface epithelium in forestomach and duodenum. 1,25VitD increases Calb9k-expression in distal intestinal sections (JJ, IL). It also seems that, regardless of the level of Ca intake, the animals are unable to absorb enough Ca in late pregnancy and early lactation to meet the growing demands and skeletal stores of Ca have to be mobilized to balance the deficit. In contrast, growing goats seem to adapt to Ca intake and accordingly absorb enough Ca for growth and Ca homeostasis.

Apparently, Ca requirements (5g per day) should be revised, since the goat kids seem not to meet the theoretical requirements at weaning. The animals are not able to eat enough to ingest enough Ca because they are adapting to the diet. From the present study, it can be concluded that although the kids received low Ca contents (2-3G per day), the growth rate and development were not influenced.

References

1. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10:141-156, 2005
2. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J Dairy Sci* 77:1936-1951, 1994
3. Brommage R, DeLuca HF: Regulation of bone mineral loss during lactation. *Am J Physiol* 248:E182-187, 1985
4. Fukuda S, Iida H: Histomorphometric changes in iliac trabecular bone during pregnancy and lactation in beagle dogs. *J Vet Med Sci* 55:565-569, 1993
5. Kessler J: Fütterungsempfehlungen und Nährwerttabellen für Wiederkäuer. Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere - RAP, LmZ, Zollikofen, 1999
6. Bronner F: Adaptation and nutritional needs. *Am J Clin Nutr* 65:1570, 1997
7. Russel G: Bone metabolism and its regulation. Bone marker, Eastell R, Baumann R, Hoyle NR, Wiecek L, Martin Dunitz Ltd, London, 2001
8. Hurwitz S: Homeostasis control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31:41-100, 1996
9. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Calcium and vitamin D metabolism during lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:253-263, 1997
10. Bronner F: Calcium absorption--a paradigm for mineral absorption. *J Nutr* 128:917-920, 1998
11. Bronner F, Pansu D, Stein WD: An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am J Physiol* 250:G561-569, 1986
12. Bronner F: Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 300:47-52, 2003
13. Pansu D, Bellaton C, Bronner F: Effect of lactose on duodenal calcium-binding protein and calcium absorption. *J Nutr* 109:508-512, 1979
14. Pansu D, Duflos C, Bellaton C, et al: Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. *J Nutr* 123:1396-1404, 1993
15. Centeno VA, Diaz de Barboza GE, Marchionatti AM, et al: Dietary calcium deficiency increases Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} extrusion mechanisms in chick enterocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 139:133-141, 2004
16. Erben RG, Segiarto DW, Weber K, et al: Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* 16:1524-1537, 2002
17. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al: The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13:325-349, 1998

18. Peng JB, Chen XZ, Berger UV, et al: Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 274:22739-22746, 1999
19. Wilkens MR, Kunert-Keil C, Brinkmeier H, et al: Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Vet J*, 2008
20. Bronner F: Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr* 117:1347-1352, 1987
21. Bronner F: Calcium transport across epithelia. *Int Rev Cytol* 131:169-212, 1991
22. Feher JJ, Fullmer CS, Wasserman RH: Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am J Physiol* 262:C517-526, 1992
23. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, et al: Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G78-85, 2003
24. Wassermann RH: Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J Nutr* 134:3137-3139, 2004
25. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ: Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373-422, 2005
26. Fleet JC, Eksir F, Hance KW, et al: Vitamin D-inducible calcium transport and gene expression in three Caco-2 cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G618-625, 2002
27. Song Y, Fleet JC: 1,25 dihydroxycholecalciferol-mediated calcium absorption and gene expression are higher in female than in male mice. *J Nutr* 134:1857-1861, 2004
28. Wassermann RH, Chandler JS, Meyer SA, et al: Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane. Symposium: Current Concepts of Calcium Absorption:662-671, 1991
29. Akhter S, Kutuzova GD, Christakos S, et al: Calbindin D9k is not required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated Ca^{2+} absorption in small intestine. *Arch Biochem Biophys* 460:227-232, 2007
30. Benn BS, Ajibade D, Porta A, et al: Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k. *Endocrinology* 149:3196-3205, 2008
31. Norman AW: Minireview: Vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147:5542-5548, 2006
32. Schröder B, Hattenhauer O, Breves G: Phosphate transport in pig proximal small intestines during postnatal development: lack of modulation by calcitriol. *Endocrinology* 139:1500-1507, 1998
33. Schröder B, Rittmann I, Pfeffer E, et al: In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *J Comp Physiol [B]* 167:43-51, 1997
34. Liesegang A, Risteli J: Influence of different calcium concentrations in the diet on bone metabolism in growing dairy goats and sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 89:113-119, 2004

35. Liesegang A, Risteli J, Wanner M: The effects of first gestation and lactation on bone metabolism in dairy goats and milk sheep. *Bone* 38:794-802, 2006
36. Liesegang A, Singer K, Boos A: Vitamin D receptor amounts across different segments of the gastrointestinal tract in Brown Swiss and Holstein Frisian cows of different age. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92:316-323, 2008
37. Liesegang A, Risteli J: Influence of different calcium concentrations in the diet on bone metabolism in growing dairy goats and sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 89:113-119, 2005
38. Goff JP, Caperna TJ, Steele NC: Effects of growth hormone administration on vitamin D metabolism and vitamin D receptors in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 7:425-433, 1990
39. Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL: Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J Dairy Sci* 74:4022-4032, 1991
40. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA: Age reduces, while pregnancy and lactation increase, intestinal 1,25 dihydroxyvitamin D receptor concentration in the rat and cow. Seventh international conference on production disease in farm animals, New York, USA:224-227, 1989
41. Staun M, Jarnum S: Measurement of the 10,000-molecular weight calcium-binding protein in small-intestinal biopsy specimens from patients with malabsorption syndromes. *Scand J Gastroenterol* 23:827-832, 1988
42. Barley NF, Howard A, O'Callaghan D, et al: Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G285-290, 2001
43. Liesegang A, Eicher R, Sassi ML, et al: Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *J Dairy Sci* 83:1773-1781, 2000
44. Liesegang A, Sassi ML, Risteli J, et al: Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. *J Dairy Sci* 81:2614-2622, 1998
45. Pérez-Llamas F, López-Contreras MJ, Blanco MJ, et al: Seemingly paradoxical seasonal influences on vitamin D status in nursing-home elderly people from a Mediterranean area. *Nutr* 24:414-420, 2008
46. Gasser J: Bone measurements by peripheral quantitative computed tomography in rodents. *Meth Mol Med* 80:323-341, 2002
47. Böck P: *Mikroskopische Technik*. München, Urban & Schwarzenberg, 1989
48. Ussing HH, Zehran K: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23, 1951
49. Milde P, Merke J, Ritz E, et al: Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors and estrogen receptors by monoclonal antibodies: comparison of four immunoperoxidase methods. *J Histochem Cytochem*:1609-1617, 1989
50. Schröder B, Göbel W, Huber K, et al: No effect of vitamin D3 treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48:353-363, 2001

-
51. Grube D: Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 67:115-134, 2004
 52. Taylor CR, Levenson RM: Quantification of immunohistochemistry - issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 49:411-424, 2006
 53. Tschuor AC, Riond B, Braun U, et al: Hämatologische und klinisch-chemische Referenzwerte für adulte Ziegen und Schafe. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 150:287-295, 2008
 54. Pugh DG: Sheep and goat medicine. Saunders Book Company, Philadelphia, 2001
 55. Schröder B, Pfeffer E, Failing K, et al: Binding properties of goat intestinal vitamin d receptors as affected by dietary calcium and phosphorus depletion. *Zentralbl Veterinärmed A* 42:411-417, 1995
 56. Lüthi S: Auswirkung einer erhöhten Calciumzufuhr auf Mineralstoffhaushalt und Knochenstoffwechsel bei Schaf und Ziege im peripartalen Zeitraum. Dissertation (in Druck), Institut für Tierernährung, Vetsuisse Fakultät, Zürich, 2009
 57. Hollis BW, Draper HH, Burton JH, et al: A hormonal assessment of bovine parturient paresis: Evidence for a role of oestrogen. *J Endocrinol* 88:161-171, 1981
 58. Liesegang A, Riner K, Boos A: Effects of gestation and lactation on vitamin D receptor amounts in goats and sheep. *Domest Anim Endocrinol* 33:190-202, 2007
 59. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, et al: Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 22:142-146, 2003
 60. Kajantie E, Dunkel L, Risteli J, et al: Markers of Type I and III collagen turnover as indicators of growth velocity in very low birth weight infants. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4299 - 4306, 2001
 61. Risteli L, Risteli J: Biochemical markers of bone metabolism. *Ann Med* 25:385-393, 1993
 62. Campbell JR, Douglas TA: The effect of low calcium intake and vitamin D supplements on bone structure in young growing dogs. *Br J Nutr* 19:339-351, 1965
 63. Du X, Zhu K, Trube A, et al: School-milk intervention trial enhances growth and bone mineral accretion in Chinese girls aged 10–12 years in Beijing. *Br J Nutr* 92: 159–168, 2004
 64. Viljakainen HT, Natri A-M, Kärkkäinen M, et al: A positive dose–response effect of vitamin D supplementation on site-specific bone mineral augmentation in adolescent girls: a double-blinded randomized placebo-controlled 1-year intervention. *J Bone Miner Res* 21:836-844, 2006
 65. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, et al: Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet, Review* 370:657-666, 2007
 66. Dillon J, Scott D: Digesta flow and mineral absorption in lambs before and after weaning. *J Agric Sci Camb* 92, 1979
 67. Pfeffer E, Thompson A, Armstrong DG: Studies on intestinal digestion in the sheep: 3. Net movement of certain inorgan elements into the digestive tract on rations containing different proportions of hay and rolled barley. *Br J Nutr* 24, 1970

68. Wylie MJ, Fontenot JP, Greene LWA: Absorption of magnesium and other macrominerals in sheep infused with potassium in different parts of the digestive tract. *J Anim Sci* 61:1219-1229, 1985
69. Höller H, Breves G, Kocabatmaz M, et al: Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. *Q J Exp Physiol* 73:609-618, 1988
70. Breves G, Goff JP, Schröder B, et al: Gastrointestinal calcium and phosphate metabolism in ruminants. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction, Engelhardt W (eds), Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology, Stuttgart, 1995
71. Nemere I, Norman AW: Transport of calcium. Handbook of physiology, section 6: the gastrointestinal system, vol IV Intestinal absorption and secretion, Shultz SG (ed), Am Physiol Soc, Bethesda, Maryland, 1991
72. Brommage R, Binacua C, Carrie AL: The cecum does not participate in the stimulation of intestinal calcium absorption by calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54:71-73, 1995
73. Boos A, Riner K, Hässig M, et al: Immunohistochemical demonstration of vitamin D receptor distribution in goat intestines. *Cells Tissues Organs* 186:121-128, 2007
74. Riner K: Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schaf und Ziege. Dissertation, Institut für Tierernährung und Veterinär-Anatomisches Institut, Vetsuisse Fakultät, Zürich, 2006
75. Riner K, Boos A, Hässig M, et al: Vitamin D receptor distribution in intestines of domesticated sheep *Ovis ammon f. aries*. *J Morphol* 269:144-152, 2008
76. Singer K: Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse. Dissertation, Institut für Tierernährung, Vetsuisse Fakultät, Zürich, 2006
77. Yamagishi N, Miyazaki M, Naito Y: The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum. *Vet J* 171:363-366, 2006
78. Yamagishi N, Yukawa YA, Ishiguro N, et al: Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49:461-465, 2002
79. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, et al: Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in target cells. *Endocrinology* 122:1224-1230, 1988
80. Taylor AN, jr WAG, Lankford JL: Immunocytochemical localization of rat intestinal vitamin D-dependent calcium-binding protein. *J Histochem Cytochem* 32:153-158, 1984
81. van Corven EJ, Roche C, van Os CH: Distribution of Ca²⁺-ATPase, ATP-dependent Ca²⁺-transport, calmodulin and vitamin D-dependent Ca²⁺-binding protein along the villus-crypt axis in rat duodenum. *Biochim Biophys Acta* 820:274-282, 1985
82. Smith MW, Bruns ME, Lawson ED: Identification of intestinal cells responsive to calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol). *Biochem J* 225:127-133, 1985
83. Walters JR, Weiser MM: Calcium transport by rat duodenal villus and crypt basolateral membranes. *Am J Physiol* 252:G170-177, 1987

84. Freeman TC, Howard A, Bentsen BS, et al: Cellular and regional expression of transcripts of the plasma membrane calcium pump PMCA1 in rabbit intestine. *Am J Physiol* 269:G126-131, 1995
85. Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, et al: The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 261:488-492, 1999
86. Peng JB, Brown EM, Hediger MA: Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News Physiol Sci* 18:158-163, 2003
87. Weber K, Erben RG, Rump A, et al: Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1287-1294, 2001
88. Rittmann I: In-vitro-Untersuchungen zum gastrointestinalen Calcium-Transport bei kleinen Wiederkäuern. Dissertation, Institut für Veterinär-Physiologie, Justus Liebig Universität, Giessen, 1996
89. Bronner F, Pansu D: Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr* 129:9-12, 1999

4 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von Calcium (Ca) und Vitamin D (Vit D) auf den Knochenstoffwechsel und die Immunreaktionen von Proteinen (Vitamin D Rezeptor, VDR und Calbindin D9k, Calb9k) im Gastrointestinaltrakt (GIT) und der Niere bei wachsenden Ziegen zu untersuchen. Dabei wurden die Ziegenmütter bereits 4 Wochen vor der Geburt Ca adäquat oder Ca restriktiv gefüttert. Besonderes Augenmerk wurde auf die unterschiedliche Anzahl der Proteine und dementsprechend auf die Ca Absorption im GIT gelegt. Es konnte bestätigt werden, wie stark sich das letzte Trächtigkeitsviertel und die ersten Laktationswochen auf den Ca-Stoffwechsel bei Ziegen auswirkte. Das Ca-Defizit konnte ohne gesundheitliche Probleme von den Tieren kompensiert werden. Alle Ziegen zeigten um den Geburtszeitpunkt eine deutliche Ca-Mobilisierung aus dem Knochen. Die Fütterung einer Ca-armen Diät zeigte einen erhöhten Knochenauf- und -abbau. Diese Ergebnisse zeigen zwar die hohe Belastbarkeit und Anpassung an verschiedene Reproduktionsphasen, aber da unsere Hochleistungstiere mittlerweile mehrere Laktationen erleben, muss auf Langzeitschäden und erschwerte Ca-Kompensationsmechanismen im Laufe der Zeit geachtet werden.

Die Ziegenlämmer zeigten ebenfalls keine gesundheitlichen Probleme. Da die Tiere im Wachstum waren, konnte ein sogenanntes Knochenremodelling dargestellt werden. In den ersten Lebenswochen fand nahezu gleichzeitig ein Knochenauf- und -abbau statt, wobei auch hier die Ca-arme Diät zu geringeren Knochendichten und -gehalten führte. Es scheint aber eine Anpassung im Laufe der Zeit statt zu finden, da nach der Schlachtung am Knochen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen messbar waren. Diese Studie zeigt auch für Lämmer eine gute Anpassung innerhalb der Ca-Homöostase, viele andere Tiere, wie bspw. Kleintiere, zeigen aber nach einer Ca-restriktiven Diät lebenslange Knochenveränderungen. In den ersten Lebensmonaten wird ein Grundstein der Knochenentwicklung und somit späteren Ca-Mobilisation gelegt und daher muss besonders in dieser Zeit auf eine adäquate Versorgung geachtet werden. Die Vit D-Injektion hatte keinen mit den hier eingesetzten Methoden messbaren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Betreffend der Ca-Mobilisation im Darm konnte mittels semiquantitativer Bestimmung des VDR kein Unterschied festgestellt werden. Die immunhistochemische Messung von Calb9k lässt einen Einfluss von Vit D erkennen. Es konnte eine gesteigerte Expression im Darm dieser Tiere gezeigt werden. Des Weiteren konnte Calbindin, im Gegensatz zu VDR, immunhistochemisch im gesamten GIT nachgewiesen werden. Es könnte sein, das Calbindin auch in Vit D-unabhängigen Transportmechanismen eine Rolle spielt oder als Modulator für

andere Proteine innerhalb der Ca-Homöostase dient. Der Pansen zeigte sich, gestützt auf die Ussing-Kammer-Technik, unter beiden Fütterungsregimes als Hauptort der aktiven Ca-Absorption. Im Duodenum konnte eine passive Ca-Netto-Absorption gezeigt werden, obwohl VDR und Calb9k die höchste Expression im Duodenum zeigten. Dies zeigt, dass der Anteil aktiver Transportmechanismen im Duodenum geringer ist. Mittels Western-Blot-Technik sollen die Proteine nochmals genauer dargestellt werden, um eine generelle Aussage des Ca- und Vit D-Einflusses treffen zu können. Die Niere als wichtiges Steuerelement von Ca wird gegenwärtig noch untersucht. Es sind weitere Forschungen nötig, um die genauen aktiven wie passiven Transportmechanismen im Vormagen, Darmtrakt und Niere aufzuklären. Die Daten von wachsenden Tieren können nicht auf Adulte übertragen werden, auch innerhalb der Spezies Wiederkäuer sind immer wieder Unterschiede zu erkennen.

Bemerkung

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Tagungen vorgestellt:

Liesegang A., K. Lauff, R. Giezendanner, I. Mittner (2008). Einfluss einer unterschiedlichen Calcium Zufuhr auf die Absorption von Calcium im Pansen und Duodenum von Ziegenlämmern. Posterpräsentation, ETH, Universität Zürich

Lauff K., A. Boos, J. Risteli, M. Kraenzlin and A. Liesegang (2008). Influence of different calcium supplies on bone metabolism, vitamin D receptor amounts and Calb9k immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids. Vortrag, 12th ESVCN, Veterinärmedizinische Universität Wien

5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mit deren Unterstützung ich jederzeit rechnen konnte:

Frau PD Dr. A. Liesegang für die Zuweisung des interessanten Themas, die fachliche und praktische Unterstützung, die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit, die gute Zusammenarbeit und vielen freundschaftlichen Stunden,

Herrn Prof. Dr. M. Wanner für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Tierernährung durchzuführen und vielen arbeitserleichternden Tipps,

Prof. Dr. A. Boos für die Übernahme des Korreferates, die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit und für die vielen hilfreichen Tipps und aufmunternden Worte zu jeder Zeit,

Prof. Juha Risteli und **Dr. Marius Kraenzlin** für die Analysen meiner Blutproben.

Sissi Hoegger, Jocelyne Leclerc, Ines Mittner und **Barbara Schneider** für unermüdliche Laborarbeiten, viele Tipps und ihre Herzlichkeit,

Den Tierpflegern, **Werni Holder** und **Alois Merkle**, und vor allem dem Metzger **Bruno Gerzner** für die Unterstützung bei der Schlachtung und der liebevollen Betreuung von Tier und mir,

Meinen Mitdotorandinnen **Barbara Zottmaier, Karin Schaufelberger, Sybil Lüthi, Regula Giezendanner, Anja Philipp, Sara Weilenmann, Martina Signer, Judith Vosmer, Carola Kaulfers** und meinem Mitdotoktorand **Thomas Häring** für die allseits tatkräftige und moralische Unterstützung und die gute Stimmung im Büro, die Stunden in und um Zürich werden mir immer in Erinnerung bleiben,

Gabriela Eger, Ursina Just, Rita Kant und **Dr. B. Wichert** für die guten Tipps und die Zusammenarbeit im Institut,

Meinen **Ziegen** und **Ziegenlämmern** für ihre geduldige Mitarbeit in der Forschung,

Meinen Freunden, ganz besonders **Marco Hohmann**, **Britta Büchter** und **Friederike Juraske** in Deutschland, **Barbara Schilcher**, **Barbara Zottmaier** und **Karina Klein** in Zürich und allen anderen, die mich jederzeit er- und getragen haben, denn ohne euch hätte ich es nicht geschafft.

Der Tierärztin **Kai S. Wilms** und dem Tierarzt **Wolfgang Zenker**, die immer an mich geglaubt haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund **Sidi**, seiner **Familie** und **meinen Liebsten** in Köln für all die Zeit voller Unterstützung und Liebe in allen Lebenslagen.

6 Curriculum Vitae

Name	Kerstin Lauff
Geburtsdatum	30.07.1979
Geburtsort	Forst/Lausitz, D
Nationalität	Deutsch

1986 - 1990	6. Oberschule, Forst/Nossdorf
1990 - 1992	2. Grundschule, Forst/Lausitz
1992 - 1994	Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium, Forst/Lausitz
1994 - 1999	Theodor-Fontane-Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe, Cottbus
1999 – 2000	Ausbildung zur Tierarzhelferin, Köln
2000 - 2007	Studium der Veterinärmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover
03/2007	Approbation als Tierärztin
2007	Doktorandin am Institut für Tierernährung der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich

März 2009
